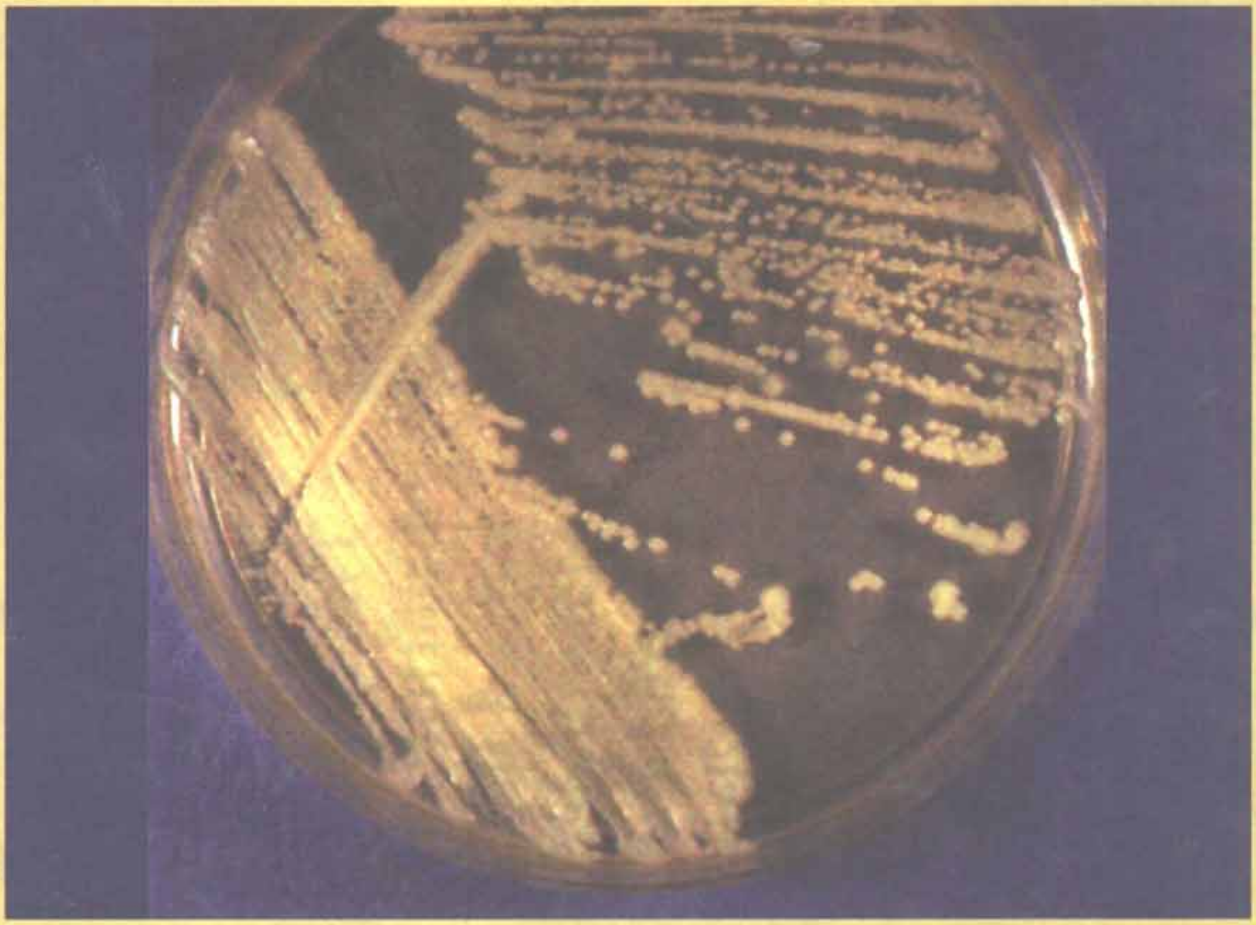
现代生物技术译丛

酵母遗传学方法实验指南

Methods in Yeast Genetics : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual



〔美〕A．亚当斯　　D．E．戈特施林
C．A．凯泽　　T．斯特恩斯

科学出版社

现代生物技术译丛

酵母遗传学方法实验指南

〔美〕A. 亚当斯　D.E. 戈特施林　C.A. 凯泽　T. 斯特恩斯 著

刘子铎 译

赵斌　喻子牛 审校

科学出版社

2000

内 容 简 介

本书通过11个有关酵母减数分裂作图、四分子分析、转化、胞导和核配、基因置换等经典实验，以及14种酵母分子生物学的技术方法，酵母蛋白质的抽提、RNA的分离、DNA的羟胺诱变、活体染色等，全面、详细地介绍了酵母遗传操作的最新技术和实验方法，很好地做到了兼顾经典和前沿两个方面，成为《分子克隆实验指南》等经典实验手册的必要补充。

全书内容丰富、新颖，文字简洁明了。适合于大专院校、科研单位的科研人员、教师、研究生、大学生作为实验指导书，亦可供从事与酵母相关生物制品行业的科技人员参考。

Alison Adams, Daniel E. Gottschling, Chris A. Kaiser, Tim Stearns
METHODS IN YEAST GENETICS: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual
©Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
图字：01－1999－2149

图书在版编目（CIP）数据

酵母遗传学方法实验指南/〔美〕A. 亚当斯等著；刘子铎译. -北京：科学出版社，2000
（现代生物技术译丛）

ISBN 7-03-007820-9

Ⅰ.酵… Ⅱ.①亚… ②刘… Ⅲ.酵母菌科-制造-遗传工程-实验
Ⅳ.TQ926-33

中国版本图书馆CIP数据核字（1999）第36695号

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717

科地亚印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000年1月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2000年1月第一次印刷 印张：9 1/4
印数：1—3200 字数：194 000

定价：30.00元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈新欣〉）

译者的话

众所周知，被西方学者誉为现代分子生物学技术“圣经”的《分子克隆实验指南》（*Molecular Cloning*：*A Laboratory Manual*）一书已风靡全球，为世人所感叹。然而，在这本“圣经”里却没有涉及有关酵母遗传学的操作技术。由于酵母作为真核生物的模式菌，在遗传学、生物化学、分子生物学、真核生物的代谢调控以及生化制品的开发等领域具有不可替代的地位。因此，冷泉港实验室（Cold Spring Harbor Laboratory）的科学家们编写了本书——《酵母遗传学方法实验指南》（*Methods in Yeast Genetics*：*A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*）一书，实际上，本书是《分子克隆实验指南》的一个重要补充。

本书系统地介绍了酵母遗传学操作最常用的实验方法，著者具有丰富的理论知识和实践经验，所编写的每个实验，都从理论基础、操作方法、必备材料、结果分析、注意事项、参考文献等作了详尽的介绍。

译稿经喻子牛教授和赵斌教授审校，旨在忠实地将原文信息奉献给读者。由于译者学识有限，译文中不妥和谬误之处在所难免，望批评指正。

华中农业大学生命科学技术学院
农业部农业微生物重点开放实验室
刘子铎
一九九九年六月二十日

序　言

这本实验教程手册编入了以前“Cold Spring Harbor Yeast Genetics Courses”中的重要部分，尽管目前大部分实验内容已经进行了修订并且还增加了一些新的实验技术，但这本教程的着重点与27年来一直使用的“Cold Spring Harbor Yeast Genetics Courses”是相同的。我们的前辈：Fred Sherman，Gerry Fink，Jim Hicks，Mark Rose，Fred Winston，Phil Hieter，Susan Michaelis和Aaron Mitchell在其执教生涯中使这本教程成为酵母遗传学研究中的一本重要文献，为此，我们对他们所作的全部贡献表示衷心的感谢。同时，我们还要对Mike Cherry在遗传和物理图谱方面所给的宝贵协助表示感谢。

A. Adams
D. E. Gottschling
C. A. Kaiser
T. Stearns

前　言

早在本世纪30年代，Winge和他的同事们就开创了酵母遗传学研究，大约10年以后，Lindegren和他的同事们也开始了更全面的研究工作，这两个研究小组的工作揭示了酵母遗传学研究的基本原理和基本方法。今天，酵母被广泛认为是一种理想的用于生化和遗传学研究的真核微生物。尽管酵母比细菌的遗传性状复杂的多，但许多用于原核微生物及其病毒的分子遗传学技术同样适用于酵母研究。酵母特别适合于遗传学研究的一些属性包括：存在稳定的单倍体和二倍体细胞，生长快速，无性繁殖，简便的平板影印，突变体分离以及通过微解剖四分体子囊从而分离得到减数分裂的每一种单倍体产物的能力。酵母已经被成功地用于遗传学研究的各个领域，例如：诱变、重组、染色体分离、基因表达和调控以及一些明显不同于真核生物系统的方面，比如线粒体遗传学等。

DNA转化使酵母可以很容易地用于基因克隆和基因工程技术，与任何一种遗传学特征相对应的结构基因都可以通过与质粒文库的互补作用而鉴定出来。DNA既能以自主复制的分子形式，又可以整合到基因组的方式而被引进酵母细胞。与大多数其他生物相比，酵母中转化DNA的整合重组主要是通过同源重组方式进行的，这样就可以有目的、高效率地将DNA序列整合到基因组中。同源重组结合高水平的基因转已经使得用基因工程DNA序列直接置换正常染色体基因座的技术得到发展。这种简便的直接基因置换技术在真核生物中是独一无二的，并已被广泛地用于酵母遗传学、细胞生物学、生理学以及生物化学的各个方面。《酶学方法》（*Methods in Enzymology*）第194卷（Guthrie and Fink 1991）和Rose（1995）的著作对现代遗传学的许多技术进行了综述。

酿酒酵母基因组DNA全序列的测定是现代遗传学最新的一项成就。它汇集了公开的序列数据库，使酵母成为真核生物细胞学功能和基因组精细研究的首选生物。一些互联网址提供了方便而有序地进入序列数据库的途径，酵母基因组数据库（Saccharomyces genome database，SGD）和慕尼黑蛋白质序列信息中心（Munich information center for protein sequences，MIPS）是两个常用的网址。这些网址通过强大的搜索功能来扩大序列数据库，其功能包括：基因组分析，相关数据库的联系，如：参阅文献数据库或酵母基因产物蛋白质结构数据库。另外，在酵母蛋白质数据库（YPD）中存有每种酵母蛋白质的数据，并能预测开放阅读框的结构信息以及开放阅读框中基因突变伴随的表型变化。

名为《酿酒酵母的分子生物学》（*The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* 1981，1982）和《酿酒酵母的分子细胞生物学》（*The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* 1991～1997）两套评论性丛书是关于酿酒酵母生物学非常有用的书籍。由于后一套丛书中某些章节收集了自第一本丛书出版以来所取得的一些新进展，所以这两套丛书的每一册都综合了大量酵母生物学文献的详细评论，这些内容是其他任何书籍所没有的。每一位酵母生物学家都应该收藏这5本书。《酵母遗传学初论》（*The Early Days of Yeast Genetics*）这本书也值得一读，因为它以历史的眼光回答了为

什么酵母会成为一种模式生物，同时还描绘了酵母遗传学研究的发展对现代遗传学和真核生物分子生物学的影响。

这本教程全面而集中地介绍了面包酵母菌——酿酒酵母。学完这本教程后，你应该能够运用酵母遗传学家常用的全部技术，比较轻松地领会各种有关文献。除了子囊解剖外，大部分方法与应用于其他微生物的方法没有太大区别，因此，一些技巧稍加实践将很快可以掌握。所有实验都将分为两人一组，如有可能，尽量使对微生物学技术比较熟悉的研究者配一个经验缺乏的伙伴。由于大多数实验将在教程一开始就进行，故建议大家仔细通读手册。请注意：由于需要连续培养，一些实验会持续数天。

值得强调的是，在这个手册里，一些操作程序已经浓缩以便节约时间，而不是以研究为目的所必须遵循的操作标准，例如，突变株通常经亚克隆起始菌株得以纯化。有些技术不可能直接用于解决问题，但它们有助于阐明基本原理和方法。

高等参考书

Broach, J. R., E. W. Jones, and J. R. Pringle. 1991. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 1, *Genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Guthrie, C. and G. R. Fink, eds. 1991. *Methods in Enzymology*, vol. 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, New York.

Jones, E. W., J. R. Pringle, and J. R. Broach. 1992. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 2, *Gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Pringle, J. R., J. R. Broach, and E. W. Jones. 1997. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 3, *Cell cycle and cell biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Strathern, J. N., E. W. Jones, and J. R. Broach, eds. 1981. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

——. 1982. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*: Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

其他与酵母有关的书

Fincham, J. R. S., P. R. Day, and A. Radford. 1979. *Fungal genetics*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

Rose, M. D. 1995. *Modern and post-modern genetics in Saccharomyces cerevisiae*. In *The yeasts* (ed. A. E. Wheals et al.), 2nd ed., vol. 6. Academic Press, New York.

Hall, M. N., and P. Linder. 1993. *The early days of yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

酵母网址

慕尼黑蛋白质序列信息中心
http://speedy.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast/
酿酒酵母基因组数据库
http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/
酵母蛋白质数据库
http://www.proteome.com/YPDhome.html

（刘子铎译）

遗传学命名法

染色体基因

用于酵母遗传学早期介绍的命名法及其规则已由 Sherman 和 Lawrence（1974）以及 Sherman（1981）作了概述。基因符号应尽量与 Demerec 等（1966）提出的标准相一致，即用三个斜体字母命名（例如：*arg*）。与 Demerec 等（1966）提出的标准相反，遗传学基因座通过跟在基因符号后的一个数字（而不是字母）来表示，如：*arg2*。显性等位基因通过使用基因符号的三个斜体大写字母来表示，如：*ARG2*。左下角小写字母则代表隐性等位基因，如：营养缺陷型 *arg2*。野生型基因用一个右上角带 + 的符号表示，如 $sup6^+$ 或 $ARG2^+$。用一个连字符号将一个数字与一个基因座标记隔开的方式表示该座位上的等位基因，如：*arg2-14*。座位序号应与原来的标记一致，但等位基因的序号可因不同实验室而异。

表型的名称通常用右上角带有 + 或 − 的罗马字的相应基因标记表示，如：用 Arg^+ 和 Arg^- 分别表示精氨酸非依赖型和精氨酸依赖型。

下面的例子说明了用于酿酒酵母遗传学命名的规则：

ARG2	一个基因座或显性等位基因
arg2	一个产生依赖精氨酸作为表型的基因座或隐性等位基因
$ARG2^+$	该基因的野生型等位基因
arg2-9	一个特异等位基因或在 *ARG2* 基因座突变
Arg^+	一个不依赖精氨酸的菌株
Arg^-	一个依赖精氨酸的菌株
Arg2p	表示 *ARG2* 基因的蛋白质产物

除了这些普遍规则外，还存在一些特殊规则。基因簇、同一基因内的互补群或一个基因中具有不同特性的区域可以用带有大写字母的相应基因座标记表示，如：*his4A*、*his4B*。

随着酵母重组 DNA 技术的广泛应用，出现了一种适合于基因插入、基因融合和质粒命名的方法：

ARG2::LEU2	*LEU2* 基因插入 *ARG2* 基因座，但插入的位置没有破坏 *ARG2* 的功能
arg2::LEU2	*LEU2* 基因插入 *ARG2* 基因座，但插入的位置破坏了 *ARG2* 的功能
arg2-101::LEU2	*LEU2* 基因插入 *ARG2* 基因座，插入的位置破坏了 *ARG2* 的功能且标明了被破坏等位基因的位置。

cyc1-arg2	*CYC1* 和*ARG2* 基因发生融合，融合后的两个基因都是无功能的
P_{cyc1}-*ARG2*	*CYC1* 基因启动子和*ARG2* 基因的融合体，融合后的 *ARG2* 基因是有功能的
[YCp-*ARG2*]	携带一个有功能 *ARG2* 基因座的着丝粒质粒
[pCK101]	表示一个具体的质粒，其结构可查资料

尽管应尽量避免使用上标，但有时为了方便也会分别使用右上标 R 或 S 来区分抗性或敏感基因。例如：控制刀豆氨酸硫酸盐抗性（*can1*）和硫酸铜抗性（*CUP1*）的基因及其敏感等位基因可分别用 can^R1、CUP^R1、CAN^S1 和 cup^S1 表示。

交配型和相关基因座的野生型和突变型等位基因的命名法并不遵循上述标准规则。交配型基因座的两种野生型等位基因用 *MAT***a** 和 *MATα* 表示；*MATα* 的两个互补群用 *MATα1* 和 *MATα2* 表示；*MAT* 基因的突变基因用 *mat***a**$^-$*1*、*matα1*$^-$*1* 表示；*HMR* 和 *HML* 基因座的野生型同宗配合等位基因用 *HMR***a**、*HMRα*、*HML***a** 和 *HMLα* 表示。这些基因座的突变型基因用 *hmr***a***-1*、*hmlα-1* 表示。*MAT***a** 和 *MATα* 细胞的交配表型分别用简单的 **a** 和 *α* 表示。

显性和隐性抑制基因应分别用带有基因座序号的 3 个大写字母或 3 个小写字母表示，如：*SUP4*、*SUF1*、*sup35*、*suf11*。在一些情况下，UAA 抑制基因和 UAG 抑制基因还要分别在基因座序号后加上 o 和 a。例如：*SUP4*-o 代表 *SUP4* 基因座的抑制基因，它将酪氨酸残基插入 UAA 位点；*SUP4*-**a** 同样代表 *SUP4* 基因座的抑制基因，但它将酪氨酸残基插入 UAG 位点。相应编码正常的酪氨酸 tRNA 并且无抑制活性的野生型座位可以用 sup_4^+ 表示。因此，酵母中抑制基因及其野生型等位基因的命名法与细菌的命名法无关。例如：用 su_4^+ 表示一种大肠杆菌赭石抑制基因，它可将酪氨酸残基同时插入 UAA 和 UAG 位点；而用 Su_4、su_4^- 或 *supC* 表示编码正常酪氨酸 tRNA 且无抑制活性的野生型等位基因。

对于大多数编码蛋白质的结构基因而言，有功能的野生型等位基因通常其突变型基因为显性。酵母中，习惯使用斜体符号如：*HIS4*、*LEU2* 来表示显性基因。因为，通常使用隐性突变位点进行遗传作图，而已发表的染色体图谱通常含有某基因的突变型。例如：染色体Ⅲ含有 *his4* 和 *leu2*，而染色体Ⅳ含有 *SUP22* 和 *FLD1*。由于大写字母被用来代表控制相同性状的显性野生型基因（如 *SUC1*，*SUC2*），而遗传学作图时使用基因的显性形式，所以在遗传学图谱中，那些染色体基因座用大写字母表示。此外，使用重组 DNA 技术与经典作图相结合的方法已经对某些 DNA 片断进行了定位，大写字母也用来为这些 DNA 片断命名，如：*RDN1*，一种编码核糖体 RNA 的片断。

非孟德尔决定因子

必要时，可以用加括弧的方法来区分非孟德尔基因型和染色体基因型。只要允许，最好使用上述方法以避免使用希腊字母来命名非孟德尔基因。但是当提到整个非孟德尔因子时，最好仍然使用原来的希腊符号 [ρ^+]、[ρ^-]、[ψ^+] 和 [ψ^-]，或分别用其音译符号表示 [*rho*$^+$]、[*rho*$^-$]、[*PSI*$^+$] 和 [*psi*$^-$]。Dujon（1981）和 Grivell（1984；

1990）提出了为线粒体突变子命名的详细方法，Wickner（1981）则为放毒者细胞株（killer strains）提出了命名法。与其他非孟德尔决定因子不同，［*PSI*$^+$］和［*URE3*］的特性并不是由核酸的构型决定的，而是由可遗传的蛋白质构象所决定的。这些特性所造成的异常结果可用朊病毒假说（prion hypothesis）来解释，这个假说也用来解释哺乳动物中出现的可传染的神经退化疾病，如：瘙痒病（Lindquist 1997）。［*PSI*$^+$］由翻译终止因子 Sup35p 的一种可遗传构象决定，而［*URE3*］由基因 *URE2*（其产物与氮素调节有关）的一种可遗传失活状态决定。酵母中已知的非孟德尔决定因子列于表 1。

表 1　酵母的非孟德尔决定子

野生型	突变型	因子	突变特征
［ρ^+］	［ρ^-］	线粒体 DNA	呼吸频率
［*KIL*-k_1］	［*KIL*-o］	RNA 质粒	对杀伤毒素敏感
［cir^+］	［cir^0］	2μ 质粒	无
［psi^-］	［*PSI*$^+$］	Sup35p 的朊病毒形式	加强无义密码的抑制作用
［$ure3^-$］	［*URE3*］	Ure2p 的朊病毒形式	对脲基琥珀摄取失去控制

遗传背景

当设计实验时，酿酒酵母基因型来源的遗传背景是一个应该考虑但又经常疏忽的方面。现代遗传学研究中使用的大部分菌株属下列菌株之一，包括：S288C、X2180、A364A、W303、Σ1278b、AB972、SK1 和 FL100。在 20 世纪 40 年代进行的野生型酵母与酿造菌株杂交（Mortimer 和 Johnston 1986）的基础上，最近对上述一些遗传背景的谱系进行了改造。分析表明，尽管大多数遗传背景具有共同的祖先，但由于异型远交仍引起一定程度的遗传异质性。实际上，远缘菌株之间的杂交经常引起不能生长的等位基因的结合，从而产生许多不能生长的孢子，但相同遗传背景菌株之间的杂交所产生的孢子，其存活率通常达 95％以上。菌株 S288C 和 A364A 遗传背景具有相似的谱系，且杂交后产生的孢子存活率很高，但通过对这些菌株的基因组序列分析发现，基因组 DNA 上每 1kb 平均有 3.4 个核苷酸序列的差异。因此，即使亲缘关系非常接近的菌株，也会在许多位点上存在差异。

不同菌株遗传背景间等位基因的差异会严重影响许多不同类型实验的结果，故最好尽可能使用单一遗传背景的材料来避免遗传的异质性。在开始筛选一种新的突变体时，最好考虑使用何种遗传背景菌株——通常最好选择在同一领域中大多数研究者使用过的遗传背景清楚的菌株。菌株 S288C 是最常用的一种，但是，其他遗传背景的菌株在特定类型的实验中有其独特的优势。例如：菌株 Σ1278b 可以形成假菌丝，而菌株 S288C 却不能，菌株 SK1（在实验三中用来进行四分体分析的菌株）比菌株 S288C 形成孢子的速度快得多。通常，必需将目标突变从一种遗传背景转移到另一种遗传背景中，在理论上，可以通过使用重组质粒和实验七中所描述的基因置换来实现。未克隆出的突变可以通过回交获得理想的菌株（通常要进行连续回交直到实现目标性状的分离比为 2:2）。

参考文献

Demerec, M., E. A. Adellberg, A. J. Clark, and P. E. Hartman. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics. 54:61～76.

Dujon, B. 1981. Mitochondrial genetics and functions. In The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance (ed. J. N. Strathern et al.), pp. 505～635. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Grivell, L. A. 1984. Restriction and genetic maps of yeast mitochondrial DNA. In Genetic maps, 3rd edition (ed. S. J. O' Brien), pp. 234～247. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

——1990. Mitochondrial DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Genetic maps, 5th edition (ed. S. J. O' Brien), pp. 3.50～3.57. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Lindquist, S. 1997. Mad cows meet psi－chotic yeast: The expansion of the prion hypothesis. Cell 89: 495～498.

Mortimer, R. K. and J. R. Johnston. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. Genetics 113:35～43.

Sherman, F. 1981. Genetic nomenclature. In The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance (ed. J. N. Strathern et al.), pp. 639～640. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sherman, F. and C. W. Lawrence. 1974. *Saccharomyces*. In Handbook of genetics: Bacteria, bac－teriophages, and fungi (ed. R. C. King), vol. 1, pp. 359～393. Plenum Press, New York.

Wickner, R. B. 1981. Killer systems in *Saccharomyces cerevisiae*. In The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance (ed. J. N. Strathern et al.), pp. 415～444. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

目　录

译者的话
序言
前言
遗传学命名法
实验篇
实验一 酵母细胞的观察 …… (3)
实验二 营养缺陷型、温度敏感型和紫外敏感型突变株的分离和鉴别 …… (8)
实验三 减数分裂作图 …… (15)
实验四 有丝分裂重组和随机孢子分析 …… (23)
实验五 酵母转化 …… (31)
实验六 胞导和核配 …… (39)
实验七 基因置换 …… (45)
实验八 *ras2* 抑制基因的分离 …… (54)
实验九 细胞型操作 …… (58)
实验十 用插入穿梭诱变法分离端粒沉默抑制基因 …… (67)
实验十一 双杂合蛋白互作分析法 …… (74)
技术和方案篇
技术和方案 1　酵母的高效转化 …… (81)
技术和方案 2　酵母菌落直接质粒转化法 …… (83)
技术和方案 3　酵母 DNA 分离 …… (84)
技术和方案 4　酵母蛋白质的抽提 …… (89)
技术和方案 5　酵母 RNA 的分离 …… (90)
技术和方案 6　质粒 DNA 的羟胺突变 …… (93)
技术和方案 7　酵母 β-半乳糖苷酶的测定 …… (94)
技术和方案 8　羧肽酶 Y 的平板鉴定 …… (97)
技术和方案 9　随机孢子分析 …… (98)
技术和方案 10　酵母活体染色 …… (99)
技术和方案 11　酵母免疫荧光 …… (100)
技术和方案 12　固定化细胞的肌动蛋白染色 …… (102)
技术和方案 13　PCR 介导基因破坏法 …… (103)
技术和方案 14　酵母菌落 PCR 方法 …… (105)
附录
附录 A　培养基 …… (109)
附录 B　菌株保存 …… (119)

附录 C　酵母遗传图谱和物理图谱 …… (120)
附录 D　模格 …… (127)
附录 E　用于 Southern 印迹作图的菌株电泳核型 …… (128)
附录 F　菌株 …… (130)
附录 G　用标准血球计数板进行酵母计数 …… (132)

实 验 篇

实验一　酵母细胞的观察

酵母细胞的直径大约为 5μm，在光学显微镜下就可观察到它的许多重要特征。在实验室中，最好定期在相差显微镜下观察酵母培养物，以掌握细胞的生理状态，避免发生污染。在大多数现代酵母细胞生物学研究中，要对经过蛋白特异抗体处理或特异结合某些细胞器的荧光染料处理后，才能对酵母细胞进行非常复杂的镜检。这个实验会提供一些将光学显微镜用于酵母细胞检测的标准类型例子。

生长培养物的检测

生长特性

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）细胞以出芽方式生长。出芽细胞称为母细胞，新产生的芽称为子细胞。细胞生长刚刚开始时，一个母细胞上就会出现一个新芽，然后，这个芽在整个细胞生长周期会不断生长直到细胞生长周期结束时才从母细胞上分离下来。由于一个酵母细胞的全部生长都集中于芽上，而且这种生长实际上贯穿于整个细胞周期，故通过观察芽的大小就可以粗略的估计出一个给定细胞处于细胞周期的什么阶段。在以指数增长的酵母细胞培养物中，大约有三分之一的细胞没有芽，三分之一的细胞出现小芽，还有三分之一的细胞出现大芽。当生活细胞耗尽营养物后，它们就会像未出芽细胞一样停止生长而滞留在细胞周期的某个阶段。因此，掌握培养物生长状态的一种简单方法就是在显微镜下确定出芽细胞的频率。注意，对一些菌株而言，尽管它们已经完成了胞质分裂，但其母细胞和子细胞仍粘附在一起。在这种情况下，镜检前必须对培养物进行振荡或超声波处理分离细胞。许多种类的突变子会停滞在细胞周期的某个阶段，从某种意义上讲，这也是它们的一种表型特征。例如：有丝分裂纺锤体缺陷的细胞会以带有大芽的形态停滞生长，通常从这点就可以判断细胞正处于细胞周期的有丝分裂阶段。需要着重指出的是，突变细胞的停滞点或最终表型在形态上与正常培养物中的其他任何细胞表型都不相同。在上述有丝分裂突变子中，母细胞和子细胞在停滞点处继续生长，结果两者均比正常酵母细胞要大得多。

单倍体与二倍体的比较

酵母单倍体和二倍体细胞在形态学上十分相似，但也存在几点重要的差异。第一，二倍体细胞比单倍体细胞大。二倍体细胞胞质体积成倍增长，且细胞直径大约是单倍体细胞的 1.3 倍。当将单倍体与二倍体细胞并排放在一起进行比较时，就会很容易发现这点差异。由于二倍体细胞比较大，所以它们（在某些情况下甚至为四倍体细胞）经常用来做荧光镜检，此时其较大的形态有助于分辨微小的细胞结构。第二，在形状上二倍体细胞呈长形或卵圆形，而单倍体细胞通常近似圆形。第三，二倍体和单倍体细胞的出芽方式不同。酵母细胞在衰老前一般出芽 20 次，在母细胞表面以定型的方式连续出芽。

单倍体细胞以沿轴向的方式出芽，每个芽与前一个芽紧密相连。二倍体细胞以极向的方式出芽，连续的芽可出现在长形的母细胞的任何一端。用钙荧光素（Calcofluor）处理细胞后就可看出细胞的出芽方式。钙荧光素是一种可以结合到几丁质环上的荧光化合物，而几丁质环则在原来的芽上，这些几丁质环被称为芽痕，只要用钙荧光素处理单倍体和二倍体细胞，就可以看出芽痕是以轴向还是以极向方式增长。

交配细胞

酵母细胞有三种交配型：*MAT*a 和 *MAT*α，这两种细胞能够相互交配形成第三种交配型 *MAT*a/α。*MAT*a/α 细胞不能与 *MAT*a 或 *MAT*α 中的任何一种交配。一般情况下，菌株 *MAT*a 和 *MAT*α 为单倍体，菌株 *MAT*a/α 为二倍体，但有时也不一定，故不能仅仅从染色体的倍性来判断细胞的交配型。在两种细胞开始交配的初期，双方互相交换信息素，这使得细胞如同无芽细胞一样停滞在细胞周期的某个阶段，并诱导交配所需蛋白质的表达。信息素也会使细胞在其表面产生一个突出物，这个突出物是进行细胞融合所必需的。突出物通常指向它所要交配的细胞。具有交配突出物的细胞称为“西蒙斯细胞”（shmoos），因为这些突出物与 20 世纪 40 年代的一个叫 Al Capp 的卡通人物十分相像。西蒙斯细胞在其凸起的顶端互相连接，接着发生胞质融合，然后是核融合，最后形成一个二倍体的 *MAT*a/α 细胞核。核融合的过程称为核配（karyogamy）。新形成的二倍体称为合子（zygote），它具有独特的外观，当出第一个芽时便可很容易地鉴别出来。通过显微操作，即使在没有遗传选择的条件下也可分离二倍体的合子。从观察大量的交配细胞中，可鉴定出西蒙斯细胞和合子。

线粒体

酵母线粒体基因组编码数种与氧化磷酸化有关的蛋白质，一种核糖体蛋白以及线粒体翻译系统所需要的 rRNAs 和 tRNAs。线粒体蛋白质的大部分结构由核基因编码并经胞质运输到线粒体。因此，无论核基因组还是线粒体基因组突变均会影响线粒体功能的发挥。线粒体 DNA 发生突变的酵母细胞不能进行氧化磷酸化，所以它们必须通过发酵作用来获取所需要的全部能量。这些突变子的生长比野生型细胞要缓慢，而且不能在非发酵性的碳源（如：乳酸、甘油或乙醇）上生长。首先发现这种线粒体突变子的法国科学家称之为“小菌落”（pepite）表型。这种菌株形成乳白色小菌落，这种缺乏色素的现象在突变子 *ade2* 中尤为明显，产生红色素是突变子 *ade2* 的特性，这一过程需经过氧化磷酸化作用。二倍体小菌落菌株也不能形成孢子，故在寻找其他不产生孢子的潜在原因之前，最好先检查一下不产孢菌株是否能在非发酵碳源中生长。小菌落突变子以较高频率出现在许多普通酵母菌株中——对一些菌株而言，培养物中 10% 的细胞为小菌落。尽管线粒体基因组或核基因组的突变均可引起小菌落现象，但绝大多数小菌落是由线粒体 DNA 突变引起的。线粒体基因组以“rho”命名；野生型菌株为 rho^+，线粒体基因组有缺陷的菌株（大多数是突变型）为 rho^-，而缺乏全部线粒体基因组的菌株为 rho^0。经常出现的错误概念是认为 rho^0 就是缺乏线粒体的菌株。通过在线粒体膜上发生的一些特有反应，即便在 rho^0 菌株中用电子显微镜也可以看到一种收缩了的线粒体结构。在该实验中，将使用荧光显微技术观察野生型细胞的线粒体和线粒体 DNA。

荧光显微技术

随着细胞生物学实验中酵母细胞使用的不断增加，原来利用动物细胞确定细胞内基因产物定位的方法已逐渐用于酵母细胞。通过对特定细胞结构中基因产物的分析，已经极大的加深了对相关基因功能的了解。另外，通过检测细胞核以及细胞骨架的形态学特征，得到了关于单个细胞细胞周期阶段的准确信息，这种方法已被用于判断细胞分裂突变子。

在本实验中，将使用3种荧光显微技术来鉴别酵母细胞的结构和蛋白。第一种方法是免疫荧光显微技术，使用这种技术首先要用目标蛋白的第一抗体与固定细胞一起保温，然后再用带有荧光标记的第二抗体与第一抗体直接作用。第一抗体和第二抗体的重叠使用可以增强潜在的荧光信号。将使用带有微管蛋白抗体的荧光显微技术来观察微管的细胞骨架，这种方法的优点是可以产生很强的荧光信号，但其缺点是观察前必须对细胞进行固定，并且为了使抗体进入细胞，必须将细胞壁去掉。值得注意的是，必须采取措施避免细胞制备中带来的假象。

第二种荧光显微技术要利用一种小分子，这种小分子可以发出荧光，并且能与特定蛋白质结合，或者与某种细胞器结合。将用DAPI（4，6-二脒基-2-苯基吲哚）标记DNA，$DiOC_6$（3，3′-二己基噁羰花青碘化物）标记线粒体，罗丹明-鬼笔环肽（rhodamine-phalloidin）标记肌动蛋白细胞骨架。DAPI与DNA特异结合，其荧光效应很强。$DiOC_6$是一种可以发出荧光的疏水分子，可特异运往线粒体。鬼笔环肽是一种来自*Amanita phalloides*蘑菇的毒素，可与肌动蛋白丝状体结合，当用鬼笔环肽标记后，即可使肌动蛋白丝状体发出荧光。DAPI既可用于固定化细胞又可用于活体细胞，$DiOC_6$只能用于活体细胞，而罗丹明-鬼笔环肽一般用于固定化细胞。

第三种方法是目前发展最快的绿色荧光蛋白（GFP），这种蛋白是来自水母*Aequoria victoria*的一种天然荧光蛋白。GFP的独特性就在于当它在细菌、真菌、植物和动物细胞中表达时，都能发出荧光，这使它成为一种理想的荧光标记蛋白。为了检测细胞内一种蛋白质的定位，就要将该蛋白质的基因与GFP的编码序列相融合，这样就产生了一种融合蛋白质。这种融合蛋白质表达后，即可在活细胞中观察到目标蛋白质的位置，在固定化细胞中同样有用。虽然需要采取一些措施以保证融合蛋白能像野生型蛋白一样正常表达，但GFP融合法毕竟是一种很有效的方法，因为它可以对活体细胞的行为进行动态观察。我们将观察一些细胞，一种是只表达GFP，另一种是表达GFP与TUB4的融合产物。TUB4是一种存在于纺锤体极体中的蛋白。

菌株

1-1	TSY623	*MATα*	*ade2 his3 leu2 ura3*
1-2	TSY807	*MATa*	*his3 leu2 lys2 ura3*
1-3	TSY800	*MATa/α*	*ADE2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 lys2/LYS2 ura3/ura3*
1-4	TSY481	*MATa/α*	*ADE2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 lys2/lys2*

ura3/ura3 [pTS568]

1-5 *TSY514* MATa *his3* *leu2* *lys2* *ura3* [pTS592]

质粒

pTS568 *CEN URA3* GFP

pTS592 *CEN URA3* TUB4-GFP

程序

安全须知

甲醛有毒并且是一种致癌物，它可以通过皮肤吸收，对眼睛、皮肤、粘膜和上呼吸道有刺激性，需带手套，安全面罩，始终保持在通风厨里操作。

DAPI 是一种可能的致癌物，如果吸入、吞咽或通过皮肤吸收将是有害的。也可能引起发炎，需带手套，面具，安全镜，不要吸入尘粉。

第 1 天

提供给你在对数期或稳定期已被固定化菌株 1-2 的培养物，使用相差或 DIC 显微镜观察，并从每个培养物中数 100 个细胞，注意无芽、出小芽和大芽的细胞数。

再提供给你已固定化菌株 1-1 和 1-2 细胞的交配混合培养物，使用相差或 DIC 显微镜检查培养物，根据它们的不同形态鉴定西蒙斯细胞和合子。

比较单倍体细胞 1-2 和二倍体细胞 1-3，找出细胞大小和形态的差异。

将下列菌株置 30℃培养过夜：

菌株 1-3 在 10ml 的 YPD 中

菌株1-3 在 5ml 的 YPEG（除了用 3%乙醇和 3%甘油代替葡萄糖作为碳源外，其他成分同 YPD）中

菌株1-4 和 1-5 在 5ml 的 SGal-ura（用 2%半乳糖作碳源的基本培养基)中，以备第二天早上之用

第 2 天

如果昨天的细菌生长过头，须稀释培养物，再培养到对数生长早期。

1）**直接加 0.5ml 甲醛（终浓度是 3.7%，标准母液是 37%）到培养物中，固定生长在 YPD 中的 5ml 菌株 1-3，室温（约 23℃）培养 1～2 小时，用一个医用离心机收集细胞，用 0.1mol/L 磷酸钾（pH 7.5）洗 2 次，在 4℃贮存细胞过夜。**

2）**按照“技术和方案 10，酵母活体染色法”，用 $DiOC_6$ 对生长在 YPD 和 YPEG 中菌株 1-3 活细胞进行染色。**

3）**按照“技术和方案 10，酵母活体染色法”，用 Calcofluor 对生长在 YPD 中的菌株 1-3 进行活细胞染色。**

4）**按上述处理把菌株 1-4 和 1-5 制成水浸片，然后用荧光素滤片观察。**

第3天

1）按照“技术和方案11，酵母免疫荧光法”，用抗微管蛋白第一抗体FITC连接的羊抗兔第二抗体和DAPI对已固定化的菌株1-3细胞（在YPD中）进行染色。
2）按照“技术和方案12，固定细胞的肌动蛋白染色法”，用罗丹明-鬼笔环肽对已固定化的菌株1-3细胞（在YPD中）进行染色。

材料

第1天

10ml YPD
5ml YPEG
10ml SGal-ura

第2天

甲醛（37%贮存液）
PBS
$DiOC_6$（10μg/ml贮存液，用乙醇配制）
Calcofluor〔1mg/ml贮存液，用100mmol/L磷酸钾溶液（pH 7.5）配制〕

第3天

Zymo lyase® 100T（120493-1，Seikagaku America Inc.）
100mmol/L磷酸钾（pH 7.5）
巯基乙醇
聚赖氨酸
PBS
-20℃的甲醇和丙酮
PBS+3%BSA
1/34体积的抗微管蛋白抗体
羊抗鼠荧光素连接的第二抗体
DAPI（Sigma D 9542或Accurate Chemical and Seientific Corp.）
封固剂
罗丹明-鬼笔环肽

实验二　营养缺陷型、温度敏感型和紫外敏感型突变株的分离和鉴别

因为自发突变的频率很低，所以通常用紫外线、亚硝酸、甲基磺酸乙酯（EMS）、硫酸二乙酯和1-甲基-硝基-亚硝基胍（1-methyl-nitro-nitrosoguanidine）等诱变剂来提高突变发生的频率。这些诱变剂十分有效且在不破坏细胞结构的条件下以$5\times10^{-4}\sim1\times10^{-2}$的频率诱发突变。虽然在有的方法中可使用制霉菌素和其他药剂杀死未突变细胞以提高突变率，但一般不需要使用这些选择方法就可以获得大量的突变株。在这个实验中，将利用EMS处理酵母细胞的方法分离营养缺陷型、温度敏感型和紫外敏感型突变株。

营养缺陷型突变株对于阐明生化反应过程及其研究酶结构和功能之间的关系具有非常重要的价值，通过对氨基酸营养缺陷型所积累中间产物的研究已经揭示了许多生化反应途径。

对温度敏感型突变株的研究将会扩大基因组遗传学研究的前景。酵母中一大部分基因参与编码必需蛋白质（例如：RNA聚合酶、tRNA合成酶等），造成这些蛋白质完全丧失活性的突变会导致细胞死亡，即使造成部分活性丧失的突变也会导致遗传和生化上的障碍。但有一种突变十分有用，它造成这些必需蛋白中一种蛋白结构发生变化，使其在低温时能发挥作用而在常温时却不能。具有这种突变的菌株在低温时能以正常或接近正常的速率生长，但在高温时却不能在任何培养基上生长。利用这种表型特征就可将发生重大功能突变的温度敏感型突变株与可补充温度敏感型突变株（即一种氨基酸生物合成存在缺陷的突变株）区分开来。全面研究温度敏感型突变株就可以确证和了解几乎整个基因组的功能，这种可能性已经在数种噬菌体中成为现实。

利用紫外敏感型（或Rad^-）突变株可以对DNA的修复和重组过程进行研究。其理论根据是DNA紫外损伤的修复需要酶系统。编码这些酶的*RAD*基因发生突变会导致细胞丧失修复紫外损伤的能力，从而使其比野生型细胞对辐射更加敏感。因为一些紫外敏感型突变株仍具备受损的重组能力，故认为DNA修复和重组有相似的发生机制。此外，一些*RAD*基因控制重要功能，它们的破坏会导致细胞死亡。

在某些情况下，能够直接筛选特定基因的突变是十分有用的。例如：有时不通过遗传杂交就能很容易将营养缺陷型标记引入菌株。直接筛选营养缺陷型突变的两种非常简单的方法是：使用αAA（α-氨基乙二酸）筛选*lys2*和*lys5*突变（Chattoo et al. 1979；Zaret and Sherman 1985）；使用5-FOA（5-氟乳清酸）筛选*ura3*和*ura5*突变（Boeke et al. 1986）。

这里所提出的标准处理法包括用EMS处理野生型酵母菌株。一半学生将诱变*MAT*a菌株，另一半学生将诱变*MAT*α菌株。诱变以后，将菌株稀释，并以每平板大约100－200个细胞的浓度涂布于完全培养基上。这些细胞长成菌落后，将它们用平板影印法转移到各种培养基上。将平板在室温（23℃）和37℃条件下培养，然后进行成

对比较，即可检测出温度敏感型突变株。将照射处理的平板与不处理的对照平板进行比较即可检测出紫外敏感型突变株。在含有葡萄糖、磷酸钾、硫酸铵、一些维生素、盐和微量矿物质的基本培养基上让菌株生长，即可检测出营养缺陷型突变株。把 YPD 平板上的菌落转接到不同的合成培养基上生长，根据生长情况可以测定出不同菌株的特殊需求，通过检测含有各种合成物的原始 YPD 平板上菌落的生长情况，就可以确定不同菌株生长所需要的特定条件。

鉴别营养缺陷型突变株，可将待测突变株按同一方式涂于 YPD 平板上。待形成菌落后，再将它们转移到含有各种不同氨基酸、嘌呤、嘧啶和其他代谢物的基本培养基上。通过观察特定菌株的生长情况，就可以检别出突变菌株生长所需要的特定条件。

库	1	2	3	4	5
6	腺嘌呤	嘌呤	半胱氨酸	甲硫氨酸	尿嘧啶
7	组氨酸	亮氨酸	异亮氨酸	缬氨酸	赖氨酸
8	苯丙氨酸	酪氨酸	色氨酸	苏氨酸	脯氨酸
9	谷氨酸	丝氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	精氨酸

一般情况下，对于含有库 1～5 中培养物的平板，一个菌落至少可在其中之一上生长，对含有库 6～9 中培养物的平板同样如此，这样就可以一个一个的鉴定出生长所需要的成分。例如：能在库 1 和 7 上生长的菌落需要组氨酸，能在库 3 和 8 上生长的菌落需要色氨酸。如果一个菌落只能在九种库中的一种上生长，那就说明它需要不止一种该库所含的营养。在芳香氨基酸生物合成早期受阻的突变株将只能在库 8 中生长。

菌株

2-1　S288C　　*MATα mal gal2*

2-2　D665-1A　*MATa*

程序

安全须知

EMS 是一种很强的诱变剂，应戴手套并在通风厨中操作，在废弃之前，用 5% 硫代硫酸钠中和所有 EMS 废液，所有操作都应使用一次性移液器。

皮肤和眼睛暴露于紫外射线下是有危险的，应该免避。为了防止暴露，照射平板应在一个带有活门装置的封闭盒里进行。

第 1 天

用上述菌株接种 5ml YPD（一半学生使用 *MATα* 菌株 2-1，另一半学生使用 *MATa* 菌株 2-2），记住用一个装有培养基而不接种的试管作为对照，在 30℃下培养过夜。

第2天

培养物将含有约 2×10^8 细胞/ml，分别转 1ml 过夜培养物到两个无菌离心管中，离心收集细胞，用无菌蒸馏水洗两次（离心 5 秒钟，酵母细胞便可沉淀）。悬浮细胞在 1ml 无菌磷酸钠缓冲液（pH 7），用计数器测定确切的细胞密度，加 30μl EMS 到其中一支离心管中，振荡分散细胞（另一管作为非诱变对照）。将两支试管置 30℃ 摇床培养 1 小时，离心，悬浮细胞于无菌水中，转入洁净离心管，用 5% 硫代硫酸钠洗两次，再悬浮细胞于 1ml 无菌水中。用 EMS 处理将引起约 40%～70% 的细胞失活。以下三步用诱变培养基进行：

1）直接把细胞涂在 αAA 培养基和 5-FOA 培养基用于筛选 *lys2* 和 *ura3* 突变株。

2）细胞在 YPD 培养基中培养过夜，然后，涂在 αAA 和 5-FOA 培养基上。

3）稀释细胞，涂 YPD 平板以便筛选其他突变菌落。

第一，直接涂 0.1ml 诱变细胞在 αAA 和 5-FOA 平板上，另外，涂 0.1ml 洗过的非诱变细胞在相同的 αAA 和 5-FOA 平板上作为对照，通过诱变和非诱变培养物所长出的菌落数可测出由 EMS 处理所引起的诱变频率。

第二，将每种细胞悬浮液 0.1ml 接到 1ml 的 YPD 培养液，在 30℃ 下培养过夜。

第三，为了获得 100～200 个成活细胞/平板，用无菌水稀释 EMS 处理细胞（细胞处在硫代硫酸钠溶液中）到 10^{-5}，稀释度可根据使用细胞的起始浓度进行调整，分别将 0.1、0.2 和 0.4ml 菌液涂于 YPD 平板上，每种菌液涂 10 套平板，室温（23℃）培养 3～4 天。

第3天

水洗来自前一天的 1ml YPD 过夜培养物，悬浮在 1ml 无菌水中，涂 0.1ml 在相同的 αAA 和 5-FOA 平板上，在 30℃ 下培养。

第5天

选择 10 套或更多含有 25～200 个菌落/平板的 YPD 平板用于分离①营养缺陷型突变株、②温度敏感型突变株和③紫外敏感型突变株。用影印法把每个 YPD 平板的菌落转到 1 个 SD 平板、1 个 SC 平板和 4 个 YPD 平板，记录被转移菌落的编号，每个平板要编号，并且在背面做一个方向性记号。对营养缺陷型突变株的检测，在 30℃ 下培养 SC 和 SD 平板 1 天。对温度敏感型突变株，从每组 YPD 影印板中取一套在 37℃ 下培养 1 天，另外一套在室温（23℃）培养 1 天。对紫外敏感型突变株，从每组 YPD 影印板中取一套用紫外光（置 Stratalinker，400μJ）处理，把经紫外照射处理和未经处理的平板在 30℃ 下培养 1 天，测数 EMS 处理后的成活率。

第6天

营养缺陷型突变株 把 10 套 SD 平板与 SC 平板进行两两比较，使用无菌牙签，把 SD 平皿上不能生长的菌落接到 9 个含有不同代谢物库的平板上，一个 SC 平板和一个 SD 平板，这样的菌落应该有 5% 左右。同时接菌株 2-1 或 2-2，在 30℃ 下培养过夜。

紫外敏感型突变株　比较照射平板与非照射平板。用牙签将照射平板上不生长的菌落接到两个 YPD 平板上，也包括菌株 2-1 或 2-2，像以前一样照射其中一个平板，在 30℃下培养两套平板过夜。

温度敏感型突变株　比较 37℃平板和 23℃平板，用牙签将在高温下不能生长的菌落接到两个 YPD 平板上，一个平板以 37℃培养 1 天，另外一个平板以室温培养，也包括菌株 2-1 或 2-2 作为对照。制作一个含有 30% 蔗糖的影印 YPD 平板，这个平板将允许这些温度敏感型突变株在 37℃生长，这是因它的缺陷在 YPD 平板上引起渗透裂解，而在高渗条件下，这种缺陷被抑制（渗透补救突变株）。

lys2 和 *ura3* 突变株　计数第 2 天和第 3 天涂布的 αAA 和 5-FOA 平板上生长的菌落数，取 2×10^8 细胞/ml 作为饱和密度的 YPD 过夜培养物，估算每个类型突变株在诱变前后和随着诱变出现生长晕（outgrowth）前后的频率。用 YPD 平板，从一套 αAA 平板中或 5-FOA 平板中分别纯化 4 个菌落用于检测它们的 Lys 和 Ura 表型，在 30℃下培养平板，每种突变型在诱变之后增加了吗？为什么诱变之后生长可能影响每种突变型的恢复？

第 7～8 天

营养缺陷型突变株　记录生长情况，给每个突变株标号，在 YPD 平板上划线突变株原种，在 30℃下培养过夜。

紫外敏感突变株　记录生长情况，给每个突变株标号，这些菌株也可用于检测它们的其他表型——X 射线敏感和烷化剂敏感以及筛选标记的恢复和重组比率。在 YPD 平板上划线接种突变株原种，30℃下培养。

温度敏感突变株　记录突变株在 23℃和 37℃下的生长情况。给每个突变株标号，在 YPD 平板上划线接种突变株原种，室温培养过夜。

lys2 和 *ura3* 突变株　用牙签将已纯化的 αAA^R 菌落接种到 SD 和 SD + ura 平板测试 Ura 表型。

第 9 天

与伙伴交换从相对交配型菌株中分离的相似表型的突变株，在 YPD 平板上杂交突变株，室温培养过夜。

第 10 天

营养缺陷型突变株　将杂交平板影印到 SD 平板用于互补试验，室温培养 1～2 天。

紫外敏感突变株　将杂交平板影印到 YPD 平板，照射。如果一个二倍体来自不同基因座突变的两个隐性 Rad^- 菌株，它将有一个正常的紫外敏感，室温培养 1～2 天。

温度敏感突变株　将杂交平板影印到 YPD 平板上，在 37℃下培养 1～2 天。

第 12 天

评价互补试验，记录来自整个班的资料，测定控制每个特征的最少基因数。

lys2 和 *ura3* 突变株　记录来自第 7～8 天 *lys2* 和 *ura3* 的生长情况。

材料

注意：提供的材料量仅供两人之用。

第1天

2支含有5ml YPD培养液的试管

第2天

无菌蒸馏水
5ml无菌0.1mol/L磷酸钠缓冲液（pH 7）
EMS（甲基磺酸乙酯；Sigma M 0880）
无菌5%硫代硫酸钠（w/v）
2支含有1ml YPD的培养管
2套αAA平板
2套5-FOA平板
30套YPD平板

第3天

2套αAA平板
2套5-FOA平板

第5天

10套SC平板
10套SD平板
40套YPD平板
无菌绒垫

第6天

11套YPD平板
9种营养库平板，每种2套
2套SD平板
4套YPD平板
2套含有30%蔗糖的YPD平板
2套SC平板
无菌绒垫

第7~8天

6套YPD平板

2套SD平板
1套SD+lys平板
1套SD+ura平板

第9~11天

5套YPD平板
5套SD平板
无菌绒垫

参考文献

营养缺陷型突变株

Lindegren, G., L. Y. Hwang, Y. Oshima, and C. Lindegren. 1965. Genetical mutants induced by ethyl methanesulfonate in *Saccharomyces*. *Can. J. Genet. Cytol.* 7: 491~499.

Lingens, F. and O. Oltmanns. 1964. Erzeugung und untersuchung Biochemischer and Mangelmutanten von *Saccharomyces cereviside*. *Z. Naturforsch.* 19B: 1058~1065.

Lingens, F, and O. Oltmanns. 1966. Uber die Mutagene Wirkung von 1-nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (NNMG) und *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.* 21B: 660~663.

温度敏感型突变株

Hartwell, L. H. 1967. Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* 93: 1662~1670.

Pringle, J. R. and L. H. Hartwell. 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance* (ed. J. N. Strathern et al.), pp. 97~142. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

紫外敏感型突变株

Cox, B. S. and J. M. Parry. 1968. The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet-light-sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* 6: 37~55.

Game, J. C. and B. S. Cox. 1971. Allelism tests of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. *Mutat. Res.* 12: 328~331.

Moustacchi, E. 1972. Evidence for nucleus independent steps in control of repair of mitochondrial damage. I. UV-induction of the cytoplasmic "petite" mutation in UV-sensitive nuclear mutants of *Saccaromyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 114: 50~58.

Resnick, M. A. 1969. Genetic control of radiation sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 62: 519~531.

营养缺陷型筛选

Boeke, J. D., F. LaCroute, and G. R. Fink. 1986. A positive selection for mutants lacking orotidine-5′-phosphate decarboxylase activity in yeast; 5′-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197: 345~346.

Chattoo, B. B., F. Sherman, D. A. Azubalis, T. A. Fjellstedt, D. Mehnert, and M. Ogur. 1979. Selection of *Lys2* mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the utilizaion of α-aminoadipate. *Genetics* 93: 51~65.

Zaret, K. S. and F. Sherman. 1985. α-Aminoadipate as a primary nitrogen source for *Saccharomyces cerevisiae* mutants of yeast. *J. Bacteriol.* 162: 579~583.

富积方法

Henry, S. A., T. F. Donahue, and M. R. Culbertson. 1975. Selection of spontaneous mutants by inositol starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 148: 5~11.

Snow, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "nystatin" Nature 211: 206~207.

Thouvenot, D. R. and C. M. Bourgeois. 1971. Optimisation de la selection de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* par la nystatine. *Ann. Inst. Pasteur* 120: 617~625.

Walton, B. F., B. L. A. Carter, and J. R. Pringle. 1979. An enrichment method for temperature-sensitive and anxotrophic mutants of yeast. *Mol. Gen. Genet.* 171: 111~114.

实验三　减数分裂作图

通过减数分裂作图（即四分体分析）和有丝分裂作图可以进行连锁研究。一个子囊内的四个孢子是一次减数分裂的产物，对这些四分体的遗传分析能提供杂合态基因的连锁关系。若已知着丝粒连锁的基因存在于杂种中，那么就可以绘出与其着丝粒相关基因的图谱。尽管从一个子囊里分离四个孢子是相当困难的技术，它需要显微操作器和大量的实践。四分体分析不仅用于连锁研究，也可用于构建遗传和生化实验所需的一些菌株，有时候，孢子可随机分离（参见实验四中的例证）。

四分体可分为三类——亲代双型（PD）、非亲代双型（NPD）和四型（T）——来源于两个杂合二倍体的两个标记 $AB \times ab$ 的关系表示如下：

PD	NPD	T
AB	*aB*	*AB*
AB	*aB*	*Ab*
ab	*Ab*	*ab*
ab	*Ab*	*aB*

随机分配　　1:1:4

连锁　　>1:<1

着丝粒连锁　　1:1:<4

如果两基因连锁，亲代双型（PD）子囊数目多于非亲代双型（NPD）子囊；如果两基因位于不同染色体上且与各自的着丝粒连锁，那么四型（T）子囊的比例就会减少。如果两基因位于不同染色体上且至少一个基因为非着丝粒连锁或者两基因在同一着丝粒上分离较远，那么就遵循独立分配，PD:NPD:T 的比例为 1:1:4。

既然非亲代双型（NPD）四分体有 4 个重组子，四型（T）四分体仅有 2 个重组子，那么重组的百分比等于：

$$100\,\frac{1/2\,(\mathrm{T})+\mathrm{NPD}}{\text{总四分体}}=100\,\frac{\mathrm{T}+2\,(\mathrm{NPD})}{2(\mathrm{PD}+\mathrm{NPD}+\mathrm{T})}$$

这个值等于两个基因间以厘摩（cM）为单位的基因图距，前提是在间隔中有最大一次交换。如没有非亲代双型（NPD）子囊，距离等于 T 型子囊百分数的一半。如果非亲代双型子囊的比例很少且连锁的标记间有两次或更少的交换，则用厘摩表示的距离大约为：

$$100\,\frac{1/2\,(\mathrm{T}-2[\mathrm{NPD}])+4(\mathrm{NPD})}{\text{总四分体}}=100\,\frac{\mathrm{T}+6\,(\mathrm{NPD})}{2(\mathrm{PD}+\mathrm{NPD}+\mathrm{T})}$$

有四种双交换子代类型，一种类型产生 PD、T，而第四种类型产生 NPD。因为只有一种是 NPD，假设在无染色体单体干扰条件下，所有双交换频率能被推断是 4（NPD）。对单一的交换必须作个修正，即减去产生四分体的双交换，因此结果修正为 T－2（NPD）。

关于干扰的若干假设必须考虑用以测定较大间隔的图距。另外，因为间距接近极限值，计算也变得不精确，惟一精确的方法是通过较短间距的累积来测量较长的间距。

一个基因与其着丝粒的间距可通过第二次分离（SDS）的频率来测量，这个频率与两个标记基因 T 型子囊的频率相似。如果基因与着丝粒间距较小，则以厘摩为单位的间距等于 SDS 百分率的一半。SDS 的百分率（对一个特定基因）在下述条件下很容易确定：如果杂种包含一个紧密连锁的着丝粒标记如 *trp1*，它与着丝粒的距离大约为一个厘摩单位。在这种情况下，SDS 的百分率等于 T 型子囊的百分率，其误差不超过 1%，这是因为 *trp1* 在第一次减数分裂时随着丝粒而分离。若杂种包含两个或更多着丝粒连锁的标记基因，它们并不像 *trp1* 靠近着丝粒，这样就可以确切地计算 SDS 的百分率。在这种情况下，SDS 的顺序由着丝粒连锁的标记基因一致性所决定。也应注意到在不同染色体上两个基因座 A 和 B 的 SDS 频率与四型子囊 $(T)_{AB}$ 的相关频率可表示为：

$$(T)_{AB} = (SDS)_A + (SDS)_B - 3/2\ (SDS)_A\ (SDS)_B$$

然而，上述关系只有在下列条件下成立：即至少其中一个标记基因与其相应着丝粒距离相当近。

当二倍体细胞转到孢子形成培养基时，通常在 4 天内发生有丝分裂和孢子形成。这时，形成孢子的培养物实际上是含有未形成孢子的二倍体细胞、拥有四个单倍体孢子的子囊和少于四个孢子的子囊组成的混合体。在孢子形成培养基上，孢子不会萌发或分裂，大多数孢子形成培养物在冰箱内可保存数月而不会失活。解剖的第一步包括用消解酶（Zymolyase）处理已形成孢子的培养物，它可以酶解子囊壁，但不会破坏子囊中四个孢子的缔合。用一个无菌接种环小心地把已酶解的子囊转到 YPD 平板上，然后使用显微操作器把四个孢子相互分离，孢子萌发并在 2～3 天后形成菌落，将孢子菌落转入斜面或 YPD 平板以便保存。将这些菌株接种 YPD 制备一个原平板，通过影印到适当的培养基可鉴定大部分表型进行分析。通过影印原平板到两个 YPD 平板和拥有 *MAT*a 和 *MAT*α 供试菌株酶活的平板上用以测定交配型，互补标记和单基因内的特定等位基因。将交配混合物在 YPD 平板培养 1 天后影印到基本培养基上。

通过对菌株 3-1 和 3-2 杂交所构建的二倍体菌株 3-3 的四分体分析，可以阐明许多技术和染色体作图的原理。本实验将提供以上菌株的孢子形成培养物，作为显微操作练习材料，只有在许多子囊已经成功地解剖后，实验方可以开始进行。

菌株

3-1	1385-3B	*MAT***a** *his4-G met13 lys2 ho*∷*LYS2*
3-2	1384-10D	*MAT*α *his4-N met4 ura3 leu2 trp1 lys2 ho*∷*LYS2*
3-3	1385-3B×1384-10D	
3-4	FW786	*MAT***a** *ade8*
3-5	FW787	*MAT*α *ade8*
3-10	ERX-17C	*MAT***a** *his4-N met4 ade8*
3-11	ERX-3C	*MAT*α *his4-G met4 ade8*
3-12	ER3a	*MAT***a** *his4-G met13 ade8*

3-13　ER3α　　*MATα his4-G met13 ade8*

注意：菌株 3-3 在 YPD 培养基上培养后将形成孢子。二倍体可以通过菌株 3-1 和 3-2 交配后重新构建。

程序

第 1 天：

显微针的制备　用玻璃显微针加到任何一种显微操作器上（Sherman 1975）进行子囊孢子的分离。一种简单的用来分离子囊孢子（也使用于细胞和合子）的显微针可用一个普通喷灯轻易制得。最近，常用一个更容易制作解剖针的方法，它只需要一些强力胶水（Super Glue）和一些光纤玻璃。下面介绍三种方法，本实验将使用最简单的第 3 种方法。

方法 1：利用喷灯将一个直径 2mm 的玻璃棒的一端拉成细尖，然后将其在小火上成直角拉出更纤细的尖头（如图 3.1 所示）。末端断开时形成一个直径为 10～100μm，长几毫米的细尖。其直径的大小不是关键，对不同的研究人员有不同的选择。较大的直径便于将子囊挑起和转移，而在细胞密度大的区域用直径较小的微针较好，一般用直径为 40μm 的显微针为宜。显微操作针的长度依操作空间高度而定，太短会因显微针基杆发光不便操作。在平板表面操作时，一般需要较长的显微针。拉出的尖端可以用刀片切断或者在两块玻片之间折断，最关键的是显微针末端要平齐，有时需要几次尝试才能成

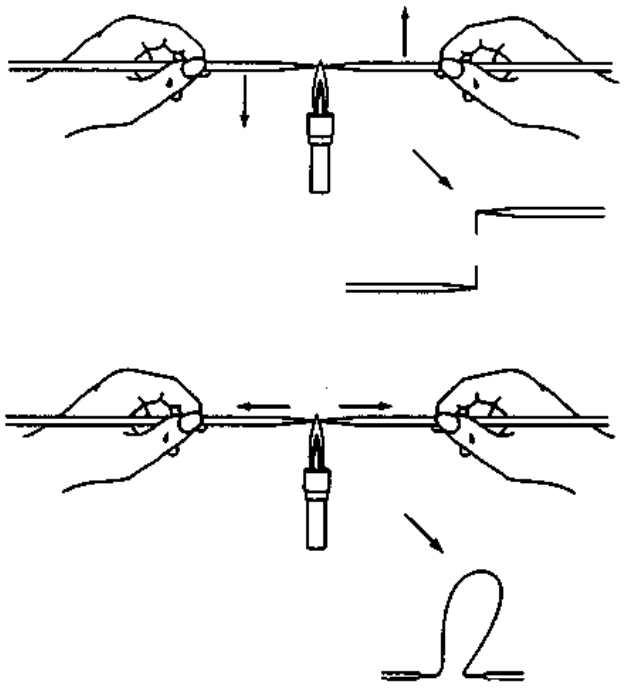


图 3.1　显微针的制作。分离子囊孢子的显微针也可以这样制作：先将 2mm 直径的玻璃棒拉出一细尖，再将末端拉成呈直角更细的尖端（上），显微针的直角尖端也可通过纤细部分拉成环制得（下）。

功。

方法 2：使用喷灯将 2mm 直径的玻璃棒拉成细丝制得显微针（Scott and Snaw 1978）。用刀片将细丝切成 2cm 长的片段，在显微镜下选择合适的直径和末端平齐的片段，将直径为 2mm 的玻璃棒端部逐渐拉细并弯曲成直角，在操作杆（mounting rod）末端沾一滴强力胶水，然后与所选出的玻璃丝片段接触（如图 3.2 所示）。相接时，将玻璃丝片段放置在与操作杆细尖轴线成直角方向上，并保证其理想的长度。胶水干后，显微针就成了一个显微操作器，这种方法适用于大量显微针制作。

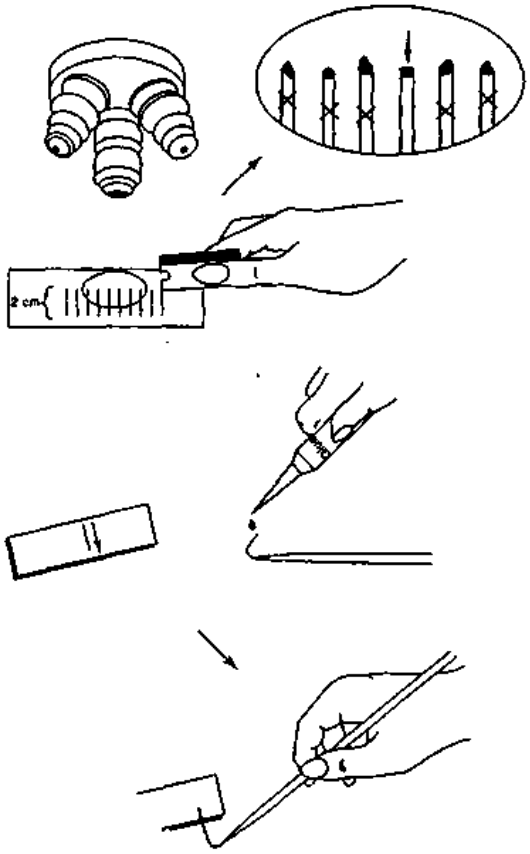


图 3.2　玻璃纤维的制作。直径约 40μm 的玻璃纤维也可制作显微针。用刀片切成约 2cm 长的片段并在显微镜下选出末端平齐的片段。用强力胶水将选出的片段成直角与一玻璃棒粘住。

方法 3 与方法 2 相似，有一点不同的是用可以买到的具有合适直径的光学玻璃纤维来代替拉出的细针。将玻璃纤维截成数段，与方法 2 一样选出末端平齐的片段，用强力胶水与一玻璃棒粘住。用一块盖玻片以 45°角切割，极易得到平齐末端的玻璃纤维，指导教师会示范这一操作。接下来，你应该将显微针装到显微操作器上，并在不同的位置试用显微针，直至能很熟练地进行操作。

用消解酶处理　在显微镜下观察形成孢子的培养物，并辨别未形成孢子的细胞以及四孢子子囊等。用一个有平齐末端的无菌牙签沾一滴培养液于 50μl 的消解酶（0.5 mg/ml消解酶溶在 1mol/L 山梨醇）中，在 30℃下培养 10 分钟，小心而缓慢地加入 0.8ml 无菌蒸馏水，放置在冰上。现在子囊分离准备就绪，将一滴子囊液转移到一个

YPD平板上，并将它们靠近平板的边缘涂成一条单线。

子囊分离　将上述YPD平板放在显微镜载物台上，操作时务必小心，不要将显微针碰断。将培养皿不停地水平旋动，以便使显微针保持在划出的孢子线上方距琼脂约2mm的部位。观察周围的孢子并选择四孢子的菌落，用显微针将其挑出在离线条5mm处的琼脂上放置，标注其位置；挑起3个孢子并移动平板离该线条5mm处，放置这3个孢子，再挑起2个孢子并移动平板离该线条5mm放置，再挑起1个孢子离该线条5mm处。选择另外的四孢子团，和上述步骤相同，孢子以5mm相隔。这样，10个四分体将分离在YPD平板的周边，将YPD平板从台上取下，注意不要碰断微针，在30℃下培养2～3天。

第2天

交配型互补和等位基因供试菌的制备　将交配型供试株3-4和3-5以及拥有*his4*、*met4*和*met13*的供试株接种到4ml的YPD：

3-10	ERX-17C	*MAT***a**	*his4-N*	*met4 ade8*
3-11	ERX-3C	*MATα*	*his4-N*	*met4 ade8*
3-12	ER3a	*MAT***a**	*his4-G*	*met13 ade8*
3-13	ER3α	*MATα*	*his4-G*	*met13 ade8*

在30℃下培养1天。

第3天：

用无菌牙签和提供的模格（见附录D），制备一个有4个活孢子菌落的原平板。在每个平板上，包括两个亲本对照菌株，将10个完整的四分体和对照按网格定位接种在一套平板中，在30℃下培养1天。

将过夜培养的交配型互补和等位基因供试菌各取0.2ml涂YPD平板，在30℃下培养1天。

第4天

把原平板影印到以下培养基：SC－his、SC－met－cys、SC－ura、SC－leu、SC－trp、SC和7个YPD平板，其中1个YPD平板作为生长阳性对照。影印一个供试菌苔到其他6个YPD平板中。所有平板在30℃下培养。（另外，孢子菌落接种到含有无菌水的一个微量滴定盘中，然后用多头接种器，将这些细胞转移到不同测试板上，教员将会示范这一操作）。

第5天

把交配型菌株3-4和3-5影印到SD平板上。把其余交配型影印到SD＋his＋met和SD＋his平板上，所有平板在30℃下培养。

第7天

统计在SD＋his＋met和SD＋his平板的生长情况。把SD＋his＋met平板影印到

SC－his平板和 Spo 平板上，这些影印板均在 30℃下培养。

统计来自第 4 天的营养缺陷型和来自第 5 天的交配型。

第 9 天

把 Spo 平板影印到 SC－his 平板上，30℃下培养，冷藏来自第 7 天的 SC－his 影印平板。

第 11 天

比较第 7 天和第 9 天 SC－his 影印平板的生长情况，统计来自第 9 天影印平板上的 His^+ 重组子数目。

材料

注意：提供的材料供 20 个四分体使用——即给每个组双倍的量。

第 1 天

2mm 直径的玻棒使用于制备显微针头
强力胶水
光学玻璃纤维
消解酶 100T（120493-1，Seikagaku America Inc.）（0.5mg/ml 溶在 1mol/L 山梨醇中）
无菌蒸馏水
1 套 YPD 平板

第 2 天

6 支含有 5ml YPD 培养管

第 3 天

8 套 YPD 平板

第 4 天

下列平板各备 2 套
- SC－his
- SC－met－cys
- SC－ura
- SC－leu
- SC－trp
- SC

14 套 YPD 平板

无菌绒垫

第 5 天

4 套 SD 平板
8 套 SD + his 平板
8 套 SD + his + met 平板
无菌绒垫

第 7 天

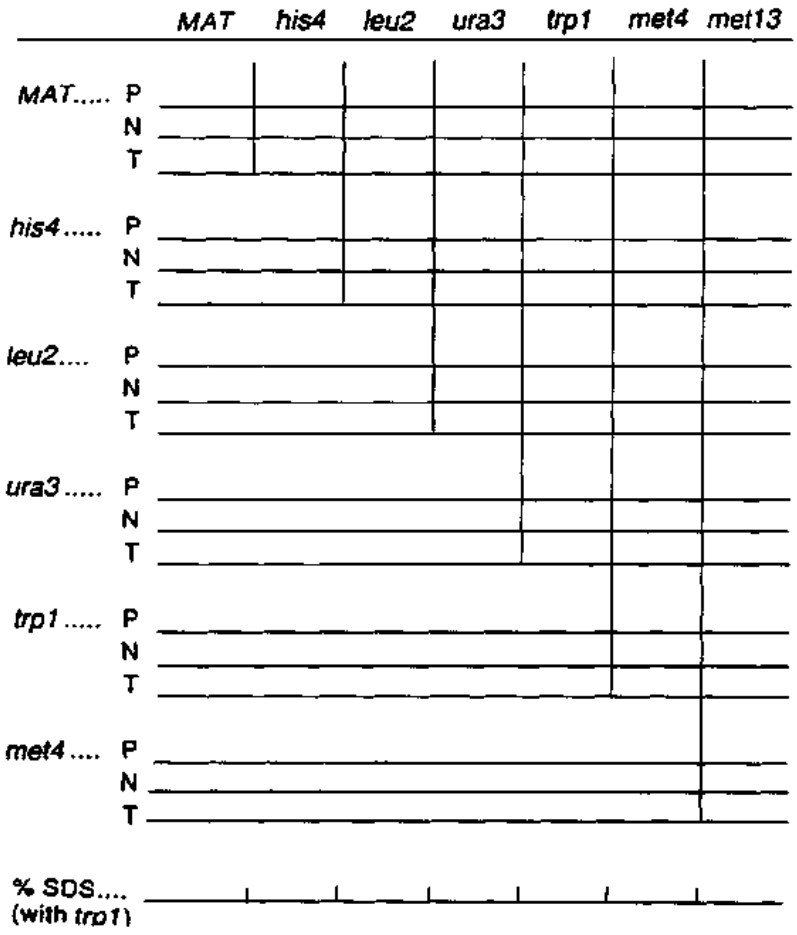
8 套 SD − his 平板
8 套 Spo 平板
无菌绒垫

第 9 天

8 套 SD − his 平板
无菌绒垫

实验三：四分体分析：3-3　　组编号 _____

姓 名 _____



参考文献

The Fincham et al. (1979) reference cited in the Introduction and Mortimer and Hawthorne (1969) give general information concerning meiotic mapping and tetrad analysis.

Mortimer, R. K. and D. C. Hawthorne. 1966. Genetic mapping in *Saccharomyces*. *Genetics* 53: 165～173. 1969. Yeast genetics. *In The yeasts* (ed. A. H. Rose and J. S. Harrison), vol. 1, pp. 385～460. Academic Press, New York.

Mortimer, R. K. and D. Schild. 1981. Genetic mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*: Life cycle and inheritance (ed. J. N. Strathern et al.), pp. 11～26. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Perkins, D. D. 1949. Biochemical mutants in the sput fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* 34: 607～626.

Scott, K. E. and R. Snow. 1978. A rapid method for making glass micromanipulator needles for use with microbial cells. J. Gen. Appl. Microbial. 24: 295～296.

Sherman, F. 1975. Use of micromaniqulators in yeast studies. *Methods Cell Biol*. 11: 189～199.

实验四　有丝分裂重组和随机孢子分析

在二倍体菌株中，世代交替时发生的有丝分裂交换、基因转变、染色体丢失都可能造成遗传信息的丢失。由于这些事件通常造成杂合菌株中一对杂合等位基因之一的丢失，故它们被称为丧失杂合性（LOH）。有丝分裂交换和基因转变的过程见图 4.1。有丝分裂交换导致距离染色体臂上交换位点远端的所有基因丧失其杂合性。有丝分裂基因转变仅仅造成一小段染色体区域（即一个基因或与其紧密连锁的几个基因）的非相互交换，认为它与减数分裂后观察到的低频率的不规则分离相类似（减数分裂基因转变）。染色体丢失会造成一个染色体两臂上所有基因丧失杂合性，由此产生的 2N－1 二倍体是否会对细胞生长产生损害就要取决于特定的染色体了。

两个非姊妹染色单体间的有丝分裂交换通常发生在细胞分裂的 G_2 期（见图 4.1）。经过有丝分裂，一次交换可以产生两个部分染色体臂为纯合的子细胞，而该部分染色体

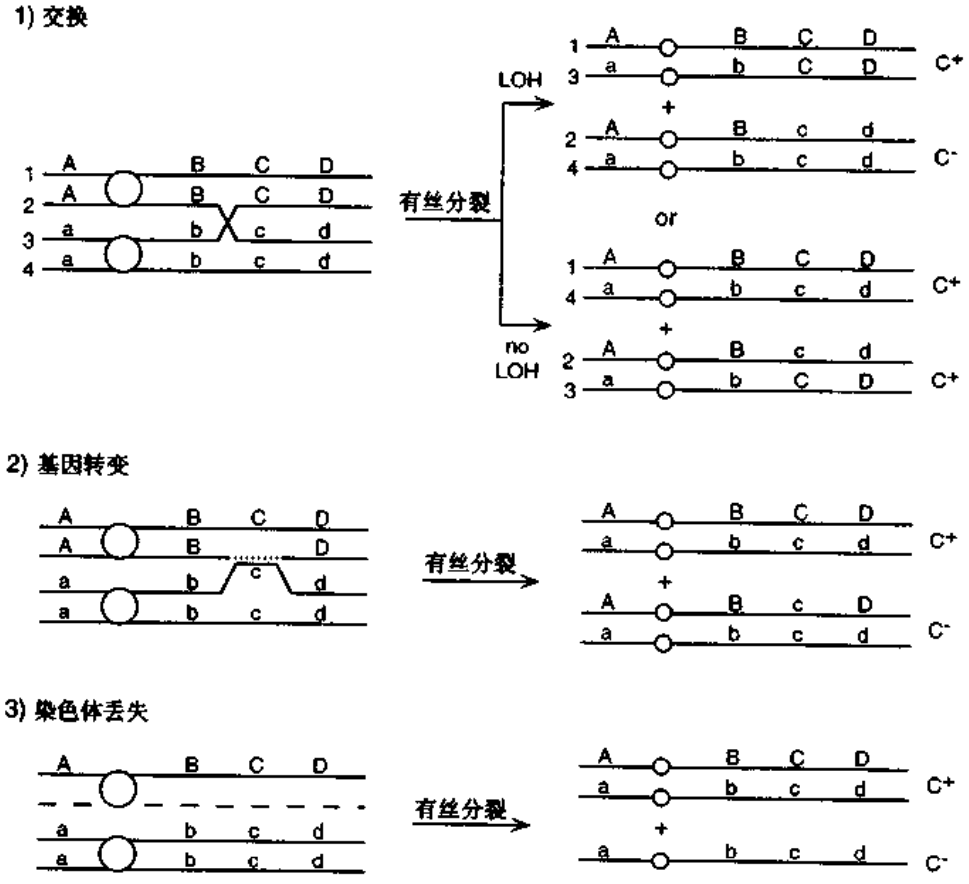


图 4.1　杂合标记在二倍体菌株中的有丝分裂分离
（1）基因交换；（2）有丝分裂的基因转变；（3）染色体丢失。

臂在母细胞中是杂合的（由于纺锤体中染色体的随机取向，这种现象只在半数重组中发生）。因此，有丝分裂重组可以导致隐性等位基因的“暴露”。有一些标记，如来自纯合子细胞的“乳突”（papillae）或“扇状”（sectors）性状标记，能够形成乳突或扇状菌落，从而可以在具有杂合型细胞的背景中观测出来。发生有丝分裂交换和有丝分裂分离的同时，位于染色体臂上重组位点末端的所有标记基因得以纯合。利用有丝分裂重组数据可以建立一个染色体臂重组图谱。一个基因的纯合频率与其距离着丝粒的远近之间存在一定的线性关系。因此，利用不同重组子的相对频率数据就可以确定两个标记之间以及一个标记与其着丝粒之间的相对距离。

有丝分裂基因转变也是 G_2 期非姊妹染色单体间重组的结果（见图 4.1）。在这种情况下，仅仅是一段有限的染色体区段被纯合化，而远端的标记仍然保持杂和状态。如果有两个或更多的标记同时发生了纯合化，则这很可能是由于有丝分裂交换而不是由于基因转变引起的，因为转变所涉及的染色体区段非常短，最多只有几千个碱基。

值得注意的是，有丝分裂重组的自发频率很低，通常在 $10^{-6}\sim10^{-4}$之间，这取决于一个特定基因与其着丝粒之间的距离以及其他一些未知因素。染色体丢失发生的频率同样很低。为了较容易地观察到这种不常发生的丧失杂合性现象，通常必须进行一个选择或筛选。在本实验中，我们将利用刀豆氨酸抗性和 5-FOA 抗性筛选来鉴定发生了丧失杂合性的细胞。

实验设计

通过以下两种单倍体菌株的杂交将产生一种二倍体菌株：

4-1 TSY812 *MAT*α *can1* *hom3* *leu2* *lys2* *ura3*
4-2 TSY813 *MAT***a** *ade2* *his1* *lys2* *trp1*

URA3 和 *CAN1* 在染色体 V 的左臂，*HIS1* 和 *HOM3* 在染色体 V 的右臂。*URA3* 和 *CAN1* 基因对于本实验特别有用，因为它们具有一种特性，即通过筛选技术可以有效的鉴定其隐性等位基因。从两基因座是杂合的二倍体开始，通过有丝分裂重组、染色体丢失或减数分裂而产生的 *ura3* 菌株可以利用其对 5-FOA 的抗性鉴定出来。而 *can1* 菌株则可以利用其对刀豆氨酸的抗性鉴定出来。

URA3 基因编码乳清酸核苷-5′-磷酸脱羧酶，这种酶在嘧啶合成的一些步骤中起催化作用。5-FOA 被细胞吸收后，在这种脱羧酶的作用下转变成有毒的化合物 5-氟尿嘧啶。*URA3*/ *URA3* 纯合子、*URA3*/*ura3* 杂合子以及 *URA3*/ 半合子（在一个二倍体菌株中只有一份基因拷贝）都能够将 5-FOA 转变成 5-氟尿嘧啶，故它们对 5-FOA 敏感（5-FOA^S），而 *ura3*/ *ura3* 纯合子以及 *ura3*/半合子由于缺乏脱羧酶活力，故对 5-FOA 有抗性（5-FOA^R）。

CAN1 基因编码精氨酸通透酶，这种酶允许细胞从培养物中吸收精氨酸。刀豆氨酸是一种有毒的精氨酸类似物，它可以在精氨酸通透酶的作用下被细胞吸收。*CAN1*/ *CAN1* 纯合子、*CAN1*/*can1* 杂合子以及 *CAN1*/ 半合子都能够吸收刀豆氨酸，故对刀

豆氨酸敏感（Can^S），而 *can1 / can1* 纯合子以及 *can1 /* 半合子由于缺乏通透酶故对刀豆氨酸有抗性（Can^R）。

丧失杂合性在每个座位发生的频率通过确定二倍体菌株 4-1×4-2 杂交后产生的 Can^R 和 5-FOA^R 的有丝分裂分离子频率来决定。这些频率将与单倍体菌株 4-2 中的 *URA3* 和 *CAN1* 的自发突变频率相比较。通过检测染色体Ⅴ相对应臂上的 Hom3 的表型就可以将有丝分裂重组与染色体丢失区分开来。通过观察丧失杂合性在 *CAN1* 而不在 *URA3* 发生的频率或在 *URA3* 而不在 *CAN1* 发生的频率，就可以确定 *URA3* 和 *CAN1* 在染色体Ⅴ上与着丝粒的相对位置。

本实验的另一部分是使用随机孢子分析检验 4-1×4-2 双倍体的减数分裂重组，用这个方法对减数分裂产物进行分离和统计，无需进行四分体分析，当需分析许多杂交体或鉴别一个罕见的重组子时，这个方法是特别有用的。然而，必须认识到，当使用随机孢子分析代替四分体分析时，会丢失有关与着丝粒连锁的一些信息，而遗传距离的精确度也不如四分体作图。这个方法的原理是通过从具有刀豆氨酸抗性的未产孢二倍体细胞中筛选单倍体减数分裂的分离子，这个细胞原本是 *CAN1 /can1* 杂合子，所有减数分离子中的一半是 Can^R，因为它们已经接纳了 *can1* 基因。

菌株

4-1	TSY812	*MATα*	*can1*	*hom3*	*leu2*	*lys2*	*ura3*
4-2	TSY813	*MAT***a**	*ade2*	*his1*	*lys2*	*trp1*	

程序

第 1 天

把菌株 4-1 和 4-2 接到 YPD 平板上，在 30℃下培养。

第 3 天

上午，把菌株 4-1 和 4-2 进行交配。把一个菌株 4-1 单菌落和一个菌株 4-2 单菌落接到同一个 YPD 平板上，在一块混合（用一滴无菌水将有助于混匀），在 30℃下至少培养 5 小时。

下午，用混合菌在 SD + lys 平皿上划线以筛选二倍体，在 30℃下培养。

第 5 天

（1）丧失杂合性　晚上，用菌株 4-1×4-2 二倍体接种 5ml YPD，用菌株 4-2 单倍体接种 5ml YPD 作对照，在 30℃下震荡培养。

（2）减数分裂重组　为了制备菌株 4-1×4-2 二倍体的孢子形成物，挑一块接在 YPD 平板上，在 30℃下培养过夜。

第 6 天

（1）突变和丧失杂合性　将菌株 4-1×4-2 二倍体混合培养液在无菌试管中制成 10

倍系列稀释度。用 100μl 的 10^{-1}、10^{-2}和 10^{-3}稀释液分别涂在 SC + 5-FOA 和 SC − arg + 刀豆氨酸平板，测定丧失杂合性频率。同时，用 100μl 的 10^{-4}和 10^{-5}稀释液涂 YPD 平板，测定活细胞频率。为了测定 *CAN1* 和 *URA3* 基因的自发突变率。需把菌株 4-2 单倍体细胞制备成类似的稀释度。然后用 100μl 的 10^{-1}和 10^{-2}稀释液涂 SC + 5-FOA 和 SC − arg + 刀豆氨酸平板。同样，也应取 100μl 的 10^{-4}和 10^{-5}稀释液涂 YPD 平板以测定活细胞数，所有的平板置 30℃培养。

（2）减数分裂重组　按照“技术和方案 9，随机孢子分析法”，将 YPD 平板的菌株 4-1×4-2 二倍体转接到液体产孢培养基中，置 25℃培养。

第 9 天

（1）突变和丧失杂合性　根据选择平板和 YPD 平板的菌落数，计算菌株 4-1×4-2 二倍体和菌株 4-2 单倍体 Can^R 和 5-FOA^R 的频率。用多头接种装置，对每种药物抗性菌株点接 22 个独立的菌落在 SC + 5-FOA、SC − arg + 刀豆氨酸、SC − met（为评估 *HOM3*）和 YPD 平板。如果你没有足够菌株 4-2 的 5-FOA^R 和 Can^R 菌落，可以涂仅有的，包括菌株 4-1×4-2 二倍体、亲本单倍体菌株 4-1 和 4-2 作为对照。

（2）减数分裂重组　按照“技术和方法 9，随机孢子分析法”，检查 4-1×4-2 培养物的孢子形成情况，如果培养物已经形成孢子，进行酶解破开四分体，用随机孢子的稀释液涂平板。

第 10 天

突变和丧失杂合性　根据片状或点状菌株的生长，计算 5-FOA 平板上初筛 Can^R 菌株的频率和在刀豆氨酸平板上初筛 5-FOA^R 菌株的频率。

第 12 天

使用多头接种装置，随机从 45 个菌株 4-1×4-2 二倍体的单个孢子菌落取样，转接到 YPD、SC − ura、SC − his、SC − met 和 SC − arg + 刀豆氨酸平板上，包括菌株 4-1×4-2二倍体和亲本单倍体菌株 4-1 和 4-2 作为对照。

第 15 天

减数分裂重组　根据点接的孢子菌落生长情况，测定 *CAN1*，*URA3*，*HIS1* 和 *HOM3* 基因之间的减数分裂重组频率。

材料

第 1 天

1 套 YPD 平板

第 3 天

1 套 YPD 平板

1 套 SD + lys 平板
无菌接种环或牙签
无菌水

第 5 天

1 套 YPD 平板
2 支含有 5ml YPD 的培养管

第 6 天

无菌离心管
5 套 SC－arg + 刀豆氨酸平板
5 套 SC + 5-FOA 平板
4 套 YPD 平板
液体孢子形成培养基
无菌水
玻璃涂布器
用于消毒的 70% 乙醇

第 9 天

2 套 SC－arg + 刀豆氨酸平板
2 套 SC + 5-FOA 平板
2 套 SC－met
2 套 YPD 平板
无菌牙签/壳板钉
多头接种装置
2 个无菌 96 孔板
“技术和方案 9，随机孢子分析法”中破开四分体所需的材料

第 12 天

1 套 SC－arg + 刀豆氨酸平板
1 套 SC－ura 平板
1 套 SC－met 平板
1 套 SC－his 平板
1 套 YPD 平板
无菌牙签/壳板钉
多头接种装置
1 个无菌 96 孔板

自发突变（菌株 4-2）

培养基	稀释度	菌落数	突变频率
5－FOA	10^{-1}		
	10^{-2}		
CAN	10^{-1}		
	10^{-2}		
YPD	10^{-4}		
	10^{-5}		

杂合性丢失（菌株 4-1×4-2）

培养基	释释度	菌落数	LOH 频率
5－FOA	10^{-1}		
	10^{-2}		
	10^{-3}		
CAN	10^{-1}		
	10^{-2}		
	10^{-3}		
YPD	10^{-4}		
	10^{-5}		

5-FOA^R 4-1 × 4-2

#	Can	Met
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
4-1		
4-2		
4-1 × 4-2		

Can^R 4-1 × 4-2

#	5 - FOA	Met
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
4-1		
4-2		
4-1 × 4-2		

减数分裂重组（随机孢子分析）

#	Can^R	Ura	His	Met
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
4-1				
4-2				
4-1 × 4-2				

#	Can^R	Ura	His	Met
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				

实验五　酵母转化

酿酒酵母是惟一能用于DNA转化的真核生物，且引入的DNA与酵母基因组DNA之间可以发生高频率的同源重组。成功的转化实验需要具备以下几个条件：①一种合适的将DNA引入细胞的方法；②引入DNA的选择标记，该选择标记在相应染色体上不发生回复突变；③克隆DNA所使用的载体可在大肠杆菌和酵母菌中复制。

转化方法

酵母转化的原始方法是在聚乙二醇（PEG）和$CaCl_2$存在的条件下，把DNA和原生质体细胞一起培养（Hinnen et al. 1978）。然而，先用碱性盐醋酸锂（LiAc）处理细胞，再与DNA和PEG一起进行培养（Ito et al. 1983），则是一种更加简便和广泛使用的方法。此外，还有以下几种方法也可将DNA引入酵母细胞（Hashimoto et al. 1985；Becker and Guarente 1991）：电转化法，即利用短暂的电脉冲使DNA渗入到细胞中；玻珠搅动法（Costanza and Fox 1988）；包裹DNA颗粒轰击法（Fox et al. 1988；Johnston et al. 1988）；以及细菌和酵母细胞的直接接合法（Heineman and Sprague 1989）。究竟使用何种方法取决于实验的目的，即是要转化受体菌株的数量还是要得到转化子的数量。转化效率往往是最重要的考虑因素，如果实验目的仅仅是要将一个质粒引入一个特定的菌株（仅需要几个菌落），那么上述任何一种方法均适合于任何一种酵母菌株；如果实验目的是为了得到10^6转化子用来构建一个筛选文库，那么就必须仔细选择所要使用的菌株和转化方法。在最适条件下，使用原生质体培养、醋酸锂处理和电转化均可产生高频率的转化。

选择标记

尽管酵母的转化频率很高，但在每次转化实验的全部细胞中只有一小部分细胞会发生转化。因此，必须有一个合适的选择标记用来筛选那些真正发生了转化的细胞。在酵母转化实验中，最常用的选择标记是利用某种特定的营养缺陷型。例如：酵母的*LEU2*基因编码β-异丙基苹果酸脱氢酶，能够对*leu2*突变株的亮氨酸缺陷型产生互补。其他一些常用的选择标记包括：*URA3*，其突变的结果为尿嘧啶缺陷型；*HIS3*，其突变产生组氨酸缺陷型；*TRP1*，其突变产生色氨酸缺陷型。导致营养缺陷型的相应染色体选择标记具有相同的重要性。这种突变应该是彻底的隐性突变和非回复性突变。例如：*leu2-3*，*112*是一种双移码突变，拥有极低的回复频率（$<10^{-10}$），可完全和野生型*LEU2*基因互补。最近，显性抗药基因如同细菌转化一样已经被当作选择标记使用于酵母转化实验中（Hadfield et al. 1990）。显性抗药基因的潜在优势在于它与酵母基因组没有任何同源性。

载体系统

在转化过程中，吸收了 DNA 的酵母细胞可以通过将 DNA 整合到染色体或通过 DNA 自主复制的方式来保持该 DNA。酵母中只有通过同源重组才会发生染色体整合。一旦整合到染色体中，转化 DNA 就成为染色体的一部分，它如同染色体一样在有丝分裂和减数分裂的分离过程中保持高度的忠实性。用于整合的质粒仅含有酵母的一个选择标记，而不含其他任何酵母基因。自主复制要求转化 DNA 含有一个酵母复制起始点，被称作 *ARS*（自主复制序列）元件，它既可以是染色体 DNA 的复制起始点，也可以是来自酵母内源 2μ 质粒的复制起始点。因为酵母复制起始点是一段相当简单和较小的 DNA 序列，所以，偶尔发现来自其他生物的 DNA 也具有酵母 *ARS* 活性。为了使酵母细胞发生稳定的转化，转化 DNA 要么必须具有与酵母基因组进行整合所必需的高度同源性，要么必须含有一个 *ARS* 元件。

具有一个染色体 *ARS* 元件的质粒（ARS 质粒）其拷贝数的变化范围很大，并且在分裂中常常不分离给子细胞（Murray and Szostak 1983），从而造成高频率的质粒丢失。自主复制质粒也可以有一个着丝粒，或 CEN 元件。一个 CEN/ARS 质粒（CEN 质粒）比简单的 ARS 质粒更加稳定，因为着丝粒在有丝分裂中使质粒附着在纺锤体上，从而保证了质粒同时分配到子细胞和母细胞中。由于分离的高度忠实性，使得质粒的拷贝数在每个细胞中保持 1～2 个左右。CEN 质粒在减数分裂中呈现典型的 2:2 分离（如果细胞只有一个拷贝）或 4:0（如果细胞至少有两个拷贝）的分离比例。

一个含有 2μ 复制起始点的自主复制质粒在有丝分裂中表现出与 CEN 质粒一样的分离忠实性，但拷贝数则高得多，通常每个细胞有 20～50 个拷贝。2μ 质粒分离的高度忠实性依赖于内源 2μ 质粒的存在。如果一个菌株缺乏内源 2μ 质粒，那么引入的 2μ 质粒将会按照 ARS 质粒的方式进行分离（Murray and Szostak 1983）。

已经对许多较早的酵母质粒进行了系统命名，在这个系统中，用 YIp 表示整合质粒，用 YRp 表示 ARS 质粒，用 YCp 表示 CEN 质粒，用 YEp（E 表示附加体）表示 2μ 质粒，YRp 质粒用的很少，因为这种质粒很不稳定。

所有标准的酵母载体除了含有酵母特异性成分外，还含有一个细菌复制起始点和一个细菌选择标记，这个标记通常为氨苄青霉素抗性标记。较早的载体（YIps，YEp24，YCp50）通常来源于 pBR322。较新的载体成分一般来源于这样一些质粒，它们在细菌中有较高的拷贝数，具有一个有用的多接头序列，同时还具有用于方便 DNA 测序的单链噬菌体复制起始点。Sikorski 和 Hieter（1989）构建了一套设计完善的酵母载体，本实验使用的就是这套载体。它们全部来源于 pRS306 并插入了 *URA3* 作为选择标记，图 5.1 表明了这套载体的结构：pRS306 插入一个 CEN/ARS 元件构成了 pRS316；而 pRS426 是 pRS306 插入一个 2μ 质粒复制起始点（多接头的方向发生了颠倒）的衍生质粒；pTS711 是带有一个酵母基因组片段的 pRS306，而且该片段包含了在多接头位点插入的酵母 *TUB4* 基因。

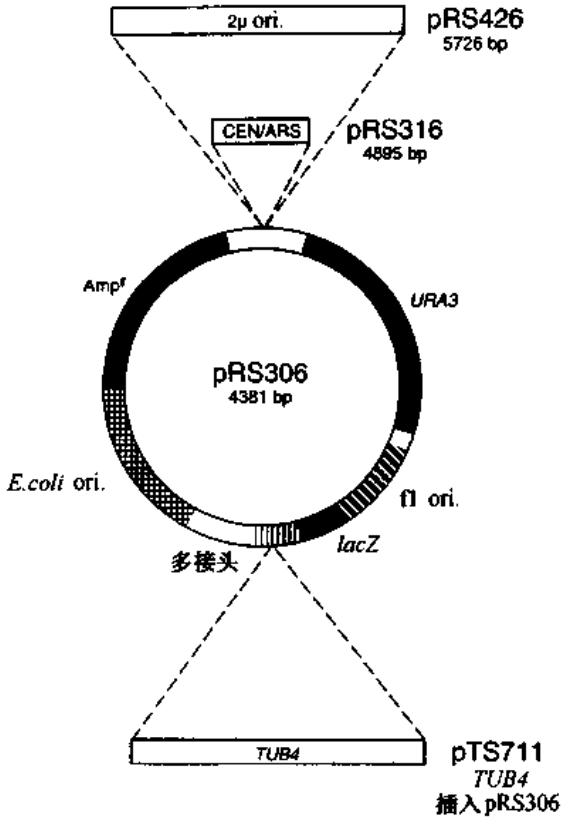


图 5.1　本实验使用的质粒

实验五（a）　整合

在大多数情况下，通过一次单交换，一个环状质粒整合到酵母基因组中，同时在质粒上的一段酵母序列产生同向重复，如图 5.2 所示。需要指出的是，整个质粒都发生了整合，包括其中的细菌序列和酵母选择标记——现在这些成分被作为整合位点的物理标记和表型标记。本实验使用的质粒 pTS711，有两个区段与酵母基因组具有同源性，也是亲本载体 pRS306 的一部分，即 *URA3* 基因和插入到 pRS306 多接头位点的 *TUB4* 基因。*TUB4* 基因编码 γ-微管蛋白，这是一种在纺锤极体中发挥关键作用的蛋白（Marschall et al. 1996）。

质粒 pTS711 由于缺乏 *ARS* 元件而不能在酵母中复制，所以只能通过整合来转化酵母细胞。整合通过同源重组既可以发生在 *URA3* 基因座，（实际上在这里使用的是 *ura3-52* 基因座）也可以发生在 *TUB4* 基因座（如图 5.2 所示）。在与酵母基因组具有同源性的区域切断质粒将会极大的提高该位点重组的特异性和频率（Orr-Weaver et al. 1981），这种游离末端具有很高的重组性，因而能够提高整合的效率，几乎可以使转化效率提高 100 倍。

在本实验中，未酶切的质粒 pTS711 将以很低的效率在 *ura3* 或 *TUB4* 进行整合转化 5-1 菌株。在 *URA3* 中的 *Nco* I 位点切断的 pTS711 将在 *ura* 发生 100% 的整合，在

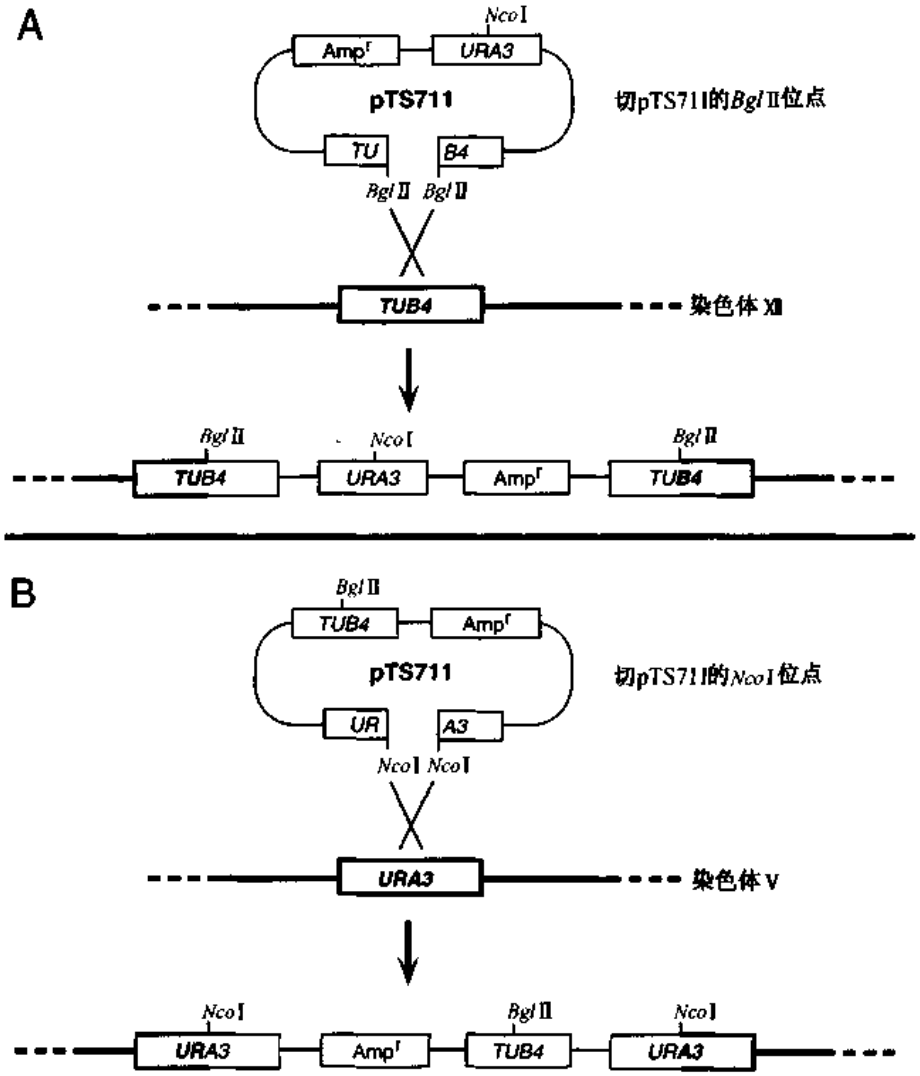


图 5.2　质粒 pTS711 在 *TUB4* 或 *URA3* 基因座的整合

TUB4 中的 *Bgl* Ⅱ位点切断的 pTS711 则在 *TUB4* 位置也发生 100% 的整合。

发生在基因座的整合可用遗传和物理手段加以证实。在本实验中，将转化子与测试菌株进行杂交以确定整合位点，通过与 *tub4'* 突变株的杂交即可检测出 *TUB4* 基因座的整合作用。如果质粒在 *URA3* 基因座发生了整合，那么质粒的 *URA3* 基因将与 *TUB4* 基因座在遗传上紧密连锁，因此，每个四分体都具有两个 Ura^+Ts^+ 和两个 Ura^-Ts^- 孢子的 PD 型，通过与 *URA3* 菌株杂交可以检测出 *ura3* 基因座的整合作用。如果质粒在 *ura3* 基因座发生了整合，那么质粒的 *URA3* 基因将与 *ura3* 基因座在遗传上紧密连锁，因此每个四分体都具有四个 Ura^+ 孢子的 PD 型。作为练习，请预测假设质粒在 *TUB4* 而不是 *ura3* 基因座发生整合的杂交结果。

实验五（b）　复制及其稳定性

用自主复制质粒 pRS316 和 pRS426 转化菌株 5-1，这些质粒的转化频率比整合型质

粒的转化效率要高。本实验还将对这些质粒有丝分裂和减数分裂的稳定性进行测定。

菌株

5-1	TSY623	*MATα*	*ade2-101*	*his3-Δ200*	*leu2-3,112*	*ura3-52*	
5-2	TSY502	*MATa*	*his3-Δ200*	*leu2-3,112*	*lys2-801*	*ura3-52*	*tub4-34*
5-3	TSY807	*MATa*	*his3-Δ200*	*leu2-3,112*	*lys2-801*	*ura3-52*	
5-4	TSY808	*MATa*	*lys2-801*				

质粒

pTS711	*TUB4*	*URA3*
pRS316	*CEN*	*URA3*
pRS426	2μ	*URA3*

程序

第1天

把菌株 5-1 接到 YPD 平板上，在 30℃下培养。

第3天

上午，把菌株 5-1 单菌落接种 5ml 的 YPD 进行活化，在 30℃下震荡培养。晚上，用血球计数器测定细胞浓度。假定繁殖一代的时间大约为 100 分钟，计算加到 100ml YPD 中的预培养物的体积以便在第 4 天上午 10 点钟使培养物浓度达 2×10^7 细胞/ml。

第4天

用离心机以 200r/min 离心收集细胞，按“技术和方案 1，酵母的高效转化”的 Li-Ac 转化法，在下列条件下转化菌株 5-1。

实验	受体菌	DNA	酶解	选择培养基
A	5-1	pTS711	无	SC－ura
	5-1	pTS711	*Nco* Ⅰ	SC－ura
	5-1	pTS711	*Bgl* Ⅱ	SC－ura
B	5-1	pRS316	无	SC－ura
	5-1	pRS426	无	SC－ura
对照	5-1	none	无	SC－ura

第 7 天

1）为了分析转化子，把它们与供试菌株杂交，用无菌牙签或接种环从每个转化平板上小心挑两个转化菌落与供试菌在 YPD 平板上混合。杂交菌株按下表组合，在 30℃下培养过夜（用含有 ts 突变株 5-2 杂交时，需在室温培养）。

转化子	供试菌	选择培养基
整合位点		
5-1 + pTS711（*Nco* Ⅰ）	5-4	SD
5-1 + pTS711（*Nco* Ⅰ）	5-2	SD + his + leu
5-1 + pTS711（*Bgl* Ⅱ）	5-4	*SD*
5-1 + pTS711（*Bgl* Ⅱ）	5-2	SD + his + leu
减数分裂稳定性检测		
5-1 + pTS711（*Bgl* Ⅱ）	5-3	SD + his + leu
5-1 + pRS316	5-3	SD + his + leu
5-1 + pRS426	5-3	SD + his + leu

2）有丝分裂稳定性的检测需要把转化子与转化平板上的非转化细胞分离，通过在 SC－ura 平板上划线使其纯化。从 *Bgl* Ⅱ切割整合质粒的转化平板中［实验五（a）第 4 天］和自主质粒转化平板［实验五（b）第 4 天］中分别纯化两个转化子，在 30℃下培养。

第 8 天

把含有杂交菌的 YPD 平板影印到适当选择培养基上，仅仅使杂交形成的二倍体细胞能够在选择平板上生长，在 30℃下培养。

第 9 天

1）为制备孢子，把生长在选择平板上的二倍体接到 YPD 平板上，室温培养 1 天。
2）从来自 SC－ura 平板纯化的转化子单菌落中取一满牙签细胞接到 5ml YPD 培养液中，在 30℃下震荡培养过夜。

第 10 天

1）把二倍体菌落从 YPD 转接到产孢培养基（分别用液体和平板培养，比较孢子形成的效率），室温培养几天。
2）对过夜培养的 5ml 培养物用无菌水做系列稀释度，涂 YPD 平板，希望控制在 100～300 个菌落/平板，在 30℃下培养。

第 12 天

1）开始解剖包括转化子在内的杂交四分体。从每个杂交实验中，解剖 10 个四分体。除

了含有菌株 5-2 的杂交体在室温下培养外，其余四分体平板均在 30℃下培养。

2）把拥有适当数量菌落的 YPD 平板影印到 SC 和 SC－ura 平板，在 30℃下培养。

第 13～14 天

1）当四分体在解剖平板上长好后，把菌株 5-3 和 5-4 的杂交体影印到 SC－ura 和 YPD 平板上，在 30℃下培养并测定 *URA3* 的分离；把与菌株 5-2 的杂交体影印到 YPD 平板上，在室温和 37℃下测定 *TUB4* 的分离。

2）统计非选择 YPD 平板上保留 Ura^+ 的细胞数。

材料

第 1 天

1 套 YPD 平板

第 3 天

1 支含有 5ml YPD 的培养管
含有 100ml YPD 的锥形烧瓶

第 4 天

“技术和方案 1，酵母的高效转化”方法中所需的材料
7 套 SC－ura 平板

第 7 天

3 套 YPD 平板
3 套 SC－ura 平板

第 8 天

1 套 SD 平板
2 套 SD＋his＋leu 平板

第 9 天

2 套 YPD 平板
3 支含有 5ml YPD 的培养管

第 10 天

15 支含有 5ml 无菌水的培养管
12 套 YPD 平板
7 支含有 2ml 孢子形成培养基的培养管
2 套产孢平板

第 12 天

10 套用于四分体解剖的 YPD 平板
6 套 SC 平板
6 套 SC－ura 平板

第 13 天

7 套 SC－ura 平板
7 套 YPD 平板

参 考 文 献

Becker, D. M. and L. Guarente. 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enymol*. 194: 182～187.

Costanza, M. C. and T. D. Fox. 1988. Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics* 120: 667～670.

Fox. T. D., J. C. Sanford, and T. W. McMullin. 1988. Plasmids can stably tranform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85: 7288～7292.

Hadfield, C., B. E. Jordan, R. C. Mount, G. H. J. Pretorius., and E. Bural 1990. G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae Curr. Genet*. 18:303～314.

Hashimoto, H., H. Morikawa, Y. Yamada, and A. Kimura. 1985. A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 21: 336～339.

Heinemann, J. A. and G. F. Sprague. 1989. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 340: 205～209.

Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink. 1978. Transformation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 1929～1933.

ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol*. 153: 163～168.

Johnston, S. A., P. Anziano, K. Shark, J. C. Sanford, and R. A. Butow. 1988. Transformation of yeast mitochondria by bombardment of cells with microprojectiles. *Science* 240: 1538～1541.

Marschall, L., R. Jeng, J. Mulholland, and T. Stearns. 1996. Analysis of Tub4p, a yeast γ-tubulin-like protein: Implications for microtubule organizing center function. *J. Cell Biol*. 134: 443～454.

Murray, A. W. and J. W. Szostak. 1983. Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* 34, 961～970.

Orr-Weaver, T., J. Szostak, and R. Rothstein. 1981. Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78: 6354～6358.

Sikorski, R. S. and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19～27.

实验六　胞导和核配

酿酒酵母单倍体菌株的有性生活周期是按一定步骤有序进行的：细胞融合形成合子，核融合（核配）形成二倍体，减数分裂形成单倍体。在正常的酿酒酵母中，细胞融合后立即发生核融合，之间不发生细胞核分裂。一旦细胞核融合后，合子就会通过有丝分裂的出芽方式产生二倍体营养细胞。

许多基因，包括 *KAR1*，是细胞接合后进行有效核配所必需的。这些基因的突变高频率地导致合子产生单倍体胞导子（cytoductant）的芽，而不是真正二倍体子代，(Berlin et al. 1991)。胞导是包含有一个亲本细胞核和两个亲本细胞质的接合后体（exconjugants)。因此，这些突变体可将非细胞核遗传信息从一个单倍体菌株传递给另一菌株，而不需要通过减数分裂。

有趣的是，已经发现在来自核配突变体的异常胞导子中，核物质能够在非融合细胞的核之间进行交换（Dutcher 1981)。在这种情况下，一个质粒或一条单独而完整的染色体从一个细胞核转移至另一个细胞核。典型的染色体转移形成一个二体菌株，即在一个单倍体核中存在一对同源染色体。

在本实验中，胞导子将通过两种相对交配型的菌株融合形成合子的方式而产生，其中一个菌株含有一个 *kar1* 突变。为了鉴定出真正的单倍体胞导子，交配组合的一方要含有一个隐性抗药基因标记（如：放线酮抗性基因 $cyh2^r$；刀豆氨酸抗性基因 $can1^r$)。同时，另一方要含有该标记的敏感性基因（如：$CYH2^S$，$CAN1^S$)，这样就可以通过简便的方法筛选出二倍体子代。

为了证明细胞质遗传因子的传递，就要获得一种线粒体缺陷型菌株。特别是具有线粒体功能缺陷的 ρ^- 突变株（小菌落)，可以通过用溴化乙锭处理细胞从而诱导线粒体 DNA 丢失而产生。区分 ρ^-（突变）和 ρ^+（野生）细胞的一种简单方法是将它们涂布于 YPDG 平板，在 30℃下培养 3～4 天。在这段时间内，ρ^+ 菌落比 ρ^- 菌落要大好几倍，因为 ρ^- 细胞不能利用甘油进行生长，培养基中葡萄糖含量又被控制在生长限量范围内。

最后，一个核质粒将在核配缺陷细胞核之间发生交换。一种带有核质粒的单倍体菌株将与另一种缺乏该质粒的菌株进行接合。可以发现，异常的胞导子含有第二种菌株的核物质，同时也含有第一种菌株的质粒。

菌株

6-1	DG21	*MATa*	*kar1*	*aro2*	*ade3*	*ura3*				
6-2	DDM30B	*MATα*	*ade2*	*can1*	*ura3*	*Δtrp1*	*Δleu2*	*ade5*	$cyh2^R$	*lys5*
6-3	PT1	*MATa*	*ile*	*hom3*	can^R					
6-4	PT2	*MATα*	*ile*	*hom3*	can^R					

质粒

pRS316：一种大肠杆菌-酵母穿梭载体，含有 *ARS* 和 *CEN6* 元件。在对该质粒的 *URA3* 基因进行筛选时，*ARS* 和 *CEN6* 元件可使质粒处于低拷贝水平。该质粒是由 Sikorski 和 Hieter（1989）构建的一种方便载体。

程序

安全须知

溴化乙锭是一种强诱变剂并有一定毒性，在使用含有这种染料的溶液时，一定要戴上手套。具体处理和操作步骤请向实验室安全管理人员查询。

第 1 天

将菌株 6-1，6-2，6-3 和 6-4 在 YPD 平板上划线以便形成单菌落。置 30℃ 培养 2 天。

第 3 天

1）用牙签从 YPD 平板上挑取 1～2 个菌株 6-1 大菌落，并将其置于无菌的 1.5ml Eppendorf 离心管中。用质粒 pRS316 转化这些 6-1 细胞（见“技术和方案 2，酵母菌落直接质粒转化法”），注意做一个不加质粒 DNA 的转化作为阴性对照，将细胞放在实验台上培养过夜。

2）晚上，将菌株 6-2 接种到两个 5ml HC 培养液中。其中一管加入溴化乙锭到终浓度为 10μg/ml。将两种培养液同时放在 30℃ 黑暗条件下震荡培养（必要时用铝箔包裹试管）。

3）从 YPD 平板上挑取一个菌株 6-3 的大菌落悬浮于 1ml 无菌水中。取 0.2ml 菌悬液均匀地涂在一个新的 YPD 平板上，以获得菌苔备用。对菌株 6-4 做同样处理，然后置 30℃ 培养 2 天。

第 4 天

1）完成质粒 pRS316 对菌株 6-1 的转化，且一定要在 42℃ 条件下热激细胞 15 分钟（见“技术和方案 2，酵母菌落直接质粒转化法”）。通过涂到 HC－ura 培养基上来筛选质粒，置 30℃ 培养 2 天。

2）用血球计数板测定菌株 6-2 的两个 HC 培养物（一个加入了溴化乙锭，另一个不加）的细胞密度。将每个培养物稀释至 500～1000 个细胞/ml（可用无菌水进行稀释）。取两个稀释液各 200μl 分别涂布于 YPDG 平板（一定要对两个平板进行标记以便区分经溴化乙锭处理和未处理的细胞），置 30℃ 培养 3 天。

第 5 天

将涂有菌株 6-3 和 6-4 的 YPD 平板从 30℃培养箱中取出，在 4℃条件下保存。以备在第 14 天使用。

第 6 天

挑选 3 个菌株 6-1 的 Ura^+ 转化子，并接种到一个 HC－ura 平板上。置 30℃培养 2 天，在 4℃条件下保存转化平板。

第 7 天

分别记录两个 YPDG 平板上的大（ρ^+）小（ρ^-）菌落数，并计算处于两种生长条件下菌株 6-2 中出现的 ρ^- 细胞频率。从每个平板上（加或未加溴化乙锭）挑一个 ρ^- 菌落并接种到 YPD 平板上，置 30℃培养 2 天。

第 8 天

将一个 YPD 平板划分为三等份，从转化子 6-1Ura^+ 的同一菌苔中挑出 2 份细胞，分别接种到一个 YPD 平板的两个等份中。将一团大小相当的菌株 6-2 细胞（取自第一天培养的平板）加到一个 6-1Ura^+ 菌斑上，在平板上充分混合。另外，将一份 6-2 细胞接种到同一平板剩下的一个等份，不混合，将平板置 30℃培养 6～8 小时。在培养末期，将 6-1Ura^+ 和 6-2 细胞形成的混合斑中的所有细胞刮下来，并将其在一个 HC－ura＋cyh 平板上划线分离单菌落。对 6-2 菌斑和 6-1Ura^+ 菌斑重复同样的步骤（作为实验的负对照），置 30℃培养 4 天。

第 9 天

分别从两个 ρ^- 6-2 菌斑中（来自第 7 天）挑出一份细胞与上述的 6-1 细胞（未用 URA3 质粒转化的细胞）相混合，此时，将 YPD 平板分为四等份。一定要把没有混合在一起的 6-1 和 6-2ρ^- 细胞包括在内作为负对照，置 30℃培养 6～8 小时。然后，将细胞刮下来并在 YPG＋cyh 平板上划线分离单菌落，置 30℃培养 4 天。

第 12 天

在第 8 天培养的细胞中，注意在 HC－ura＋cyh 平板上的细胞生长，将交配的细胞同每一个未混合的对照相比较。从 HC－ura＋cyh 平板上的混合细胞中挑 3 个菌落，在一个 HC－ura 平板上将其划成 3 条分开的长 2cm 的直线，间距为 0.5cm。另外，将一个原始的 6-1Ura^+ 转化子置于同一平板上作为对照，置 30℃培养 2 天。

第 13 天

注意：第 9 天的 YPG＋cyh 平板上细胞的生长，将交配的细胞同每一个未混合的对照相比较。从 YPG＋cyh 平板上的混合细胞中挑出 3 个菌落接到一个 YPD 平板上。另外将菌株 6-1 和 6-2 ρ^- 突变株置于同一平板上作为对照，置 30℃培养 1 天。

第 14 天

1) 将第 12 天和第 13 天接种的细胞影印到下列平板上：

HC－ade
HC－trp
HC－leu
HC－ura
HC－lys
HC＋can－arg
YPD＋cyh
YPD
YPG

2) 把每个影印的菌团交叉影印到拥有菌株 6-3 和 6-4 的 TPD 上，在 30℃下培养所有平板。

第 15 天

把每个交叉盖印的 YPD 平板影印到一个 SD 平板上。

第 16 天

观察和比较所有平板，包括 SD 平板，以确定分离株是否属单倍体。

材料

第 1 天

4 套 YPD 平板
无菌水
无菌 Eppendorf 离心管

第 3 天

“材料与方案 2，酵母菌落直接质粒转化法”所需的所有材料
1μg pRS316 质粒 DNA
2 支含有 5ml HC 培养液的培养管
1mg/ml 的溴化乙锭母液（用水制备）
无菌水

第 4 天

2HC－ura 平板
2 套 YPDG 平板

第 6 天

1 套 UC－ura 平板

第 7 天

1 套 YPD 平板

第 8 天

1 套 YPD 平板
3 套 HC－ura＋cyh 平板

第 9 天

1 套 YPD 平板
4 套 YPG＋cyh 平板

第 12 天

1 套 HC－ura 平板

第 13 天

1 套 YPD 平板

第 14 天

下面平板各制 2 套：

HC－ade
HC－trp
HC－leu
HC－ura
HC－lys
HC＋can－arg
YPD＋cyh
YPG
YPD

无菌压舌板

第 15 天

2 套 SD 平板

本实验部分取自 F. Sherman，G. Fink 和 J. Hicks 的早期版本。

参考文献

Berlin, V., J. A.Brill, J. D. Boeke, and G. R. Fink. 1991. Genetic screens and selections for cell and nuclear fusion mutants. *Methods Enzymol*. 194: 774.

Dutcher, S. k. 1981. Internuclear transfer of genetic information in kar1-1/KAR 1 heterokaryons in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol*. 1: 245

Sikorski, R. S. and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19~27.

实验七　基因置换

基因置换是酵母研究中最有效和最重要的技术之一。这种技术允许一个基因在它的正常染色体位置与其离体条件下创造的等位基因进行置换，使置换前后的菌株仅仅在这个特殊的等位基因上存在遗传差异。使用这种方法，可以分析在基因克隆中由无效突变（null mutation）（译者：由于大片段插入、缺失或重排而导致基因表达产物完全失去功能）或其他任何类型突变所引起的表型变化。无论在理论上或在实践中，一个克隆的酵母基因均有可能发生突变，然后通过重组进入基因组，从而精确的置换野生型等位基因。

测定一个基因的无效表型是研究这个基因功能的关键一步。首先，它揭示了这个基因是否是生长所必需的。其次，如果这个基因不是生长所必需的，该方法又可以用来研究完全丧失了某种特殊功能（由于该基因的置换而导致）的菌株。为了检测到由无效突变而引起的表型变化，基因置换一般应在二倍体中进行，因为单倍体的无效突变体可能无法生存。这种现象可以通过孢子繁殖中的四分体分析观测到。如果某个基因是生存所必需的，则四分体孢子的分离比为 2:2；如果这个基因不是生存所必需的，则所有的四个孢子都能存活，其中有两个孢子属于无效突变体。

实验七（a）　一步基因破坏法

通常，一步基因置换（Rothstein 1983）是利用包含有突变等位基因和欲融合基因座具有末端同源的限制性片段通过转化而实现的。但是，为了创造具有突变等位基因的片段，就必须对目标基因进行克隆，然后用限制性内切酶酶解，使基因或基因的一部分被一段在酵母中编码选择性标记的 DNA 片段所置换。由于这些操作所固有的局限性，通常很难创造一个真正的全部编码序列被准确替换的无效等位基因。然而，现在利用 PCR 介导基因破坏法（Baudin et al. 1993，Lorenz et al. 1995）在酵母中无效突变相当容易。

PCR 介导基因破坏法的根据是：酵母中线性 DNA 片段间的同源重组效率非常高，仅需 40bp 同源区即可进行相当高效率的重组。PCR 介导基因破坏法和酿酒酵母全基因组序列相结合，使得任何基因不必对其进行克隆即可使其发生相应的无效突变。而且，已经构建出一系列质粒和菌株来提高这种技术的成功率（Brachmann et al. 1997），这些质粒包含了一个保守位点上的普通酵母可选择标记，这样就可以使用一组 PCR 引物和选择标记来破坏基因（见图 7.1）。酵母能从基因组中完全删除普通营养缺陷型标记，这样就减少了可能产生在染色体组中可选择标记与其突变等位基因间不希望产生基因转变的背景发生。

基因破坏法通常用来分析一个目标基因的无效等位基因的表型效应。在本试验中，将中断一种蛋白酶基因构建出一种在生化实验中十分有用的菌株。用生化方法制备酵母

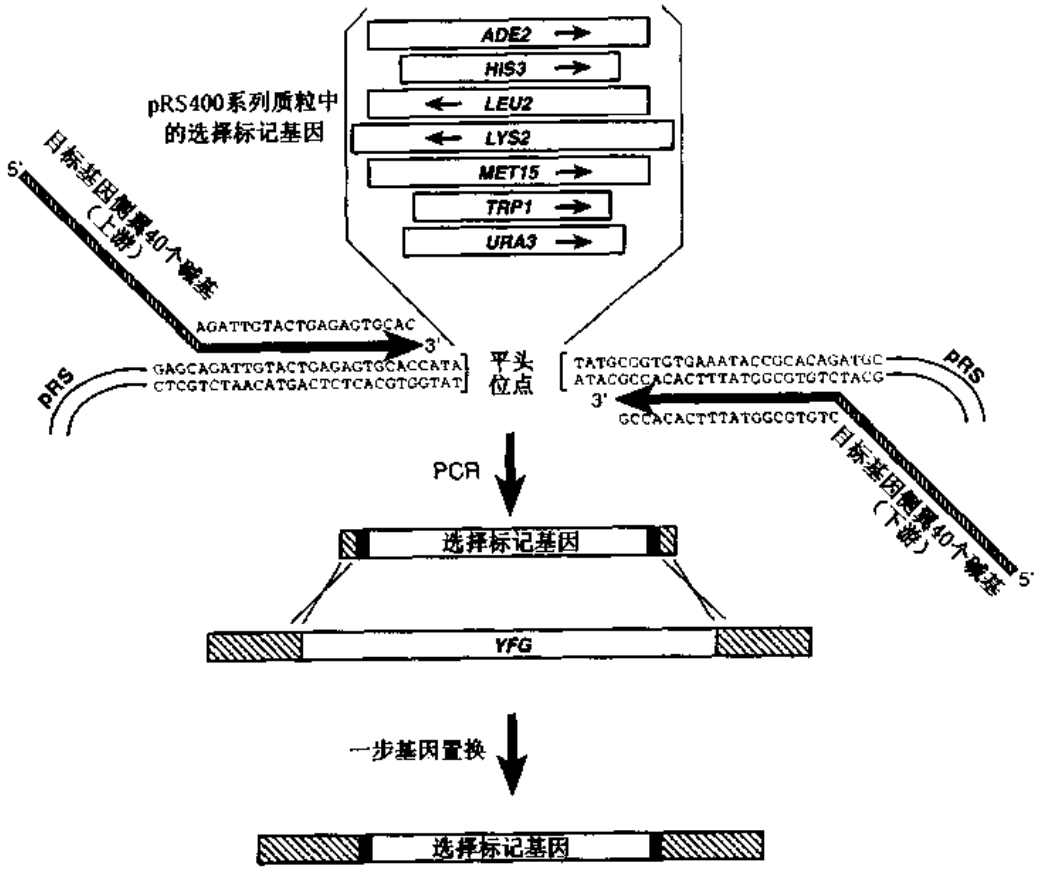


图 7.1　一步基因置换法

细胞抽提物的障碍之一就是酵母细胞液泡中丰富的蛋白酶，当细胞破裂时这些酶就会释放出来。一种完全缺乏蛋白酶的菌株需要中断每个编码液泡蛋白酶的不同基因。幸运的是，有一种方法仅用一步即可消除大部分蛋白酶。液泡蛋白酶首先以无活性的酶原形式合成，然后在液泡中经蛋白水解作用去除前肽变为活性肽。主要的蛋白水解酶—蛋白酶 A 由基因 *PEP4* 编码，中断 *PEP4* 就可以阻止所有其他蛋白酶变为活性肽，这种方法的复杂性在于蛋白水解酶 B 也能分解前肽从而激活液泡蛋白酶。在缺乏蛋白水解酶 A 的情况下，有活性的蛋白水解酶 B 仍能在几个细胞生长周期内继续激活液泡蛋白酶，但蛋白水解酶 B 的自我激活能力并不是无限的。一旦蛋白水解酶 B 的活性降低到某一临界值以下，细胞就会不可逆地转变为无蛋白酶细胞。当中断 *PEP4* 之后，再将破坏了 *PEP4* 的菌株连续几代划线分离单菌落以稀释蛋白水解酶 B，从而最终获得无蛋白酶活性菌株。

已经破坏 *PEP4* 基因的转化菌落可以用一种不同的 PCR 方法来筛选，这种方法可以直接用来筛选菌落，而不需要从酵母中提纯 DNA。用平板分析、鉴定羧肽酶 Y 的活性，就可以将具有 *pep4* 基因型的转化体筛选出来。羧肽酶 Y 是一种需要蛋白水解酶 A 和蛋白水解酶 B 活化的液泡酶。

菌株

7-1　BY4732　*MATα　his3 Δ200 met15 Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0*

质粒

pRS303 是携带有酵母 *HIS3* 基因的大肠杆菌载体，可用于 PCR 介导基因破坏的模板。

程序

第 1 天

将菌株 7-1 在 YPD 平板上划线，置 30℃培养。

第 3 天

挑取一个丰满的菌株 7-1 的菌落，接种到 5ml YPD 培养液，置 30℃培养过夜。

第 4 天

用血球计数板（见附录 G）测定 5ml 菌株 7-1 培养物的细胞密度。在装有 50 ml YPD 的锥形烧瓶中将细胞稀释至 5×10^6 细胞/ml，置 30℃培养细胞到两次分裂（约 4 小时）。

按照“技术和方案 1，酵母的高效转化”方法收获细胞，用 1μg *pep4∷HIS3* 的 PCR 扩增 DNA 进行转化，所提供的 DNA 母液是按照“技术和方案 13，PCR 介导基因破坏法”，使用 RS303 作载体模板。制备的两个引物为：

5′PEP4DEL

TGGTCAGCGCCAACCAAGTTGCTGCAAAAGTCCACAAGGCAGATTGTACTGAG
AGTGCAC

3′PEP4DEL

AATCGTAAATAGAATAGTATTTACGCAAGAAGGCATCACCCTGTGCGGTATT
TCACACCG

必须做一个不加 DNA 的转化作为阴性对照，将每种转化液涂到 HC－his 平板，置 30℃培养 3 天。

第 7 天

挑 11 个转化子，在 HC－his 平板上划单菌落，仅使用 3 个平板，每个平板可划出 3～4 个转化子，置 30℃培养 2 天。

第 9 天

1）从 11 个转化子中，分别挑一个菌落在 HC－his 平板（来自第 7 天）上划线，使用

"技术和方案 14，酵母菌落 PCR 方法"检测 *PEP4* 基因是否已经破坏。须用菌株 7-1 作对照。扩增 DNA 使用以下两个引物：

5′PEP4　GCTTGAAAGCATTATTGCCATTGGCC

3′PEP4　GGCCAAACCAACCGCATTGTTGCCC

2）在进行 PCR 扩增的同时，制备 1.5% 琼脂糖凝胶，电泳检测每个菌落的 PCR 产物。加 3μl 琼脂糖凝胶上样缓冲液到每个 PCR 样品中，将反应物全部上样，包括 DNA 标准分子量标记。野生型 *PEP4* 基因将产生一个约 1.2kb 带，而 *pep4∴ HIS3* 等位基因有一个预计 1.4kb 的带。

3）将 3 个 *pep4∴ HIS3* 转化子和菌株 7-1 在 YEPD 平板上划线，每个平板划两个菌株，置 30℃ 培养 3 天。

第 12 天

按照"技术和方案 8，羧肽酶 Y 的平板检测"方法，用 APE 蛋白酶平板检测法检测 YEPD 平板上的菌落，注意辨别菌落之间的颜色差异。

材料

第 1 天

1 套 YPD 平板

第 3 天

1 支含有 5ml YPD 的培养管

第 4 天

"技术和方案 1，酵母的高效转化"方法中所需的材料。

含有 50ml YPD 培养基的锥形烧瓶

2 套 HC－his 平板

第 7 天

3 套 HC－his 平板

第 9 天

"技术和方案 14，酵母菌落 PCR 方法"所需的材料

约 120pmole DNA 引物：

5′PEP4　GCTTGAAAGCATTATTGCCATTGGCC

3′PEP4　GGCCAAACCAACCGCATTGTTGCCC

用于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳所需材料和设备

2 块 YPD 平板

“技术和方案 8，羧肽酶 Y 的平板检测”方法所需的材料

实验七（b）　两步基因置换法

常用的第二种基因置换方法是两步法（Scherer and Davis 1979），这种方法首先要整合一个含有突变等位基因的质粒，当在目标位点发生整合作用时，将导致这一基因区段的重复——一个为野生型，另一个为突变型。两者之间含有一段质粒序列，重复的两个拷贝之间的同源交换将导致质粒的切除以及重复区段中两个拷贝之一的丢失。根据交换的准确定位，留下的拷贝要么为突变型，要么为野生型（如图 7.2 所示）。这些拷贝可以通过表型或 Southern 杂交分析加以区分，若质粒上的可选择标记为 URA3，则质粒最容易被切除；使用 5-氟乳清酸（5-FOA）培养基可以挑选出丢失质粒的菌株。

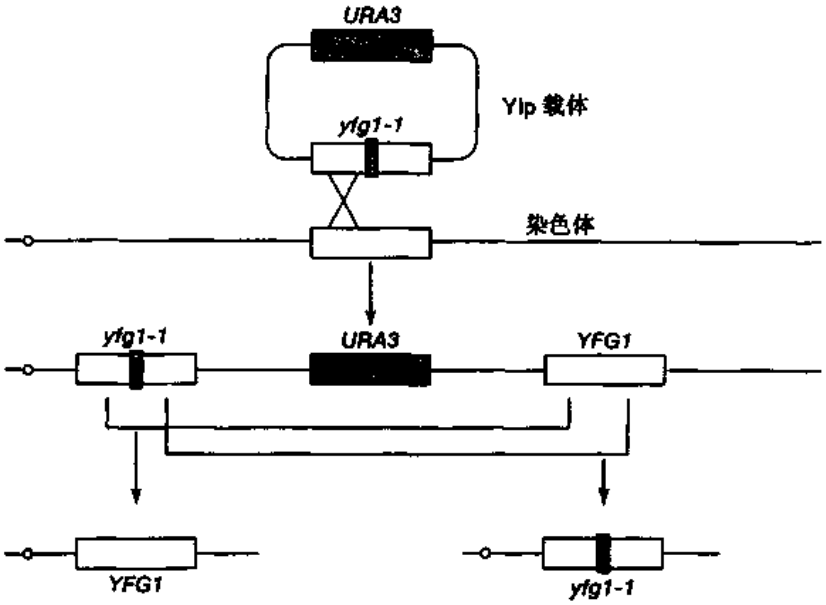


图 7.2　两步基因置换法

通过单交换使质粒整合到染色体导致 *YFG1* 基因座重复，一个拷贝含有野生型 *YFG1* 基因，另一个拷贝含有 *yfg1-1* 突变，使用 5-FOA 培养基筛选切除质粒的菌株，根据交换体的定位，留下的切除子（excision）要么是 *YFG1*，要么是 *yfg1-1*。

两步基因置换法在下列两种情况下使用：

1）如果目标突变没有可选择的表型，则不能使用一步法直接进行选择。一种特殊基因的温度敏感等位基因置换就属这种情况。使用两步法，能够筛选出含有突变等位基因的凸环质粒的重组子。

2）使用两步法，从相同的起始转化子菌株中能产生野生型和突变型菌株。这样就能提供除目标基因之外的其他基因纯合的菌株。两步基因置换法在实验九中将用于

MAT 基因座交配型等位基因的转换。

实验七（c）质粒改组

除了通过基因置换分析表型外，当目标基因位于自主质粒上时还可以用来筛选突变表型，尤其可以用来鉴定必需基因的条件致死等位基因。使用质粒改组（plasmid-shuffle）技术（Boeke 等 1987），可以对一个含有目标基因的质粒进行诱变，再将经过诱变的质粒转入酵母，然后在无效基因背景下筛选条件突变表型（如图 7.3 所示）。具体方

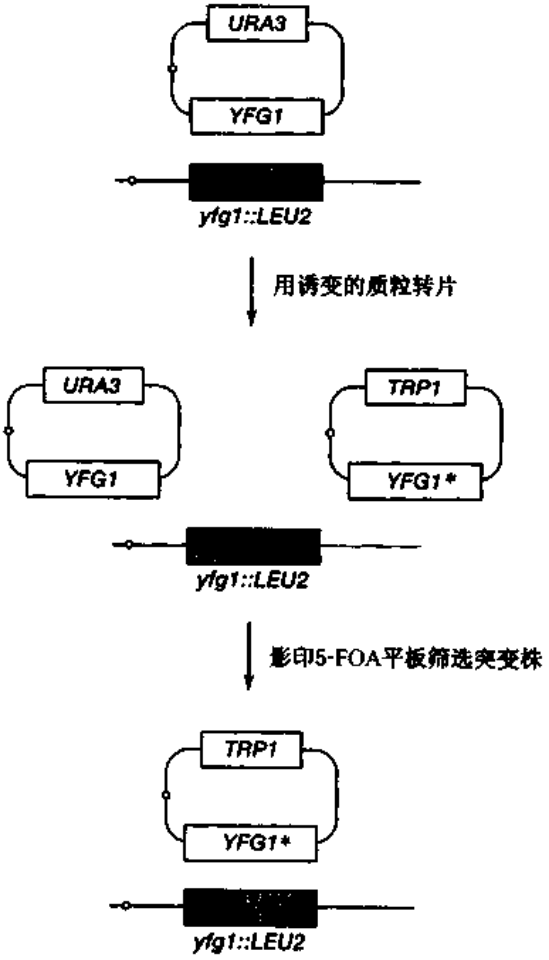


图 7.3　质粒的改组

法是转化一种菌株，该菌株已经含有①以 *URA3* 基因作为可选择标记基因的自主质粒，其质粒上具有目标基因的野生型基因和②基因组中目标基因的无效等位基因。这样一种菌株，其生存力取决于质粒上的野生型基因所编码蛋白质的功能。用诱变的质粒库转化后（使用不同于 *URA3* 的选择标记），就可以通过在不同条件下（如温度、培养基等）影印到 5-FOA 平板上，根据菌株的生长情况加以筛选，只有那些丢失了含有 *URA3* 和野生型基因的质粒的细胞才能在 5-FOA 平板上生长，而由突变质粒引起的表型才能表达。

尽管早已知道真核生物染色体上的DNA与组蛋白紧密结合形成染色质，但组蛋白的生物学功能直到最近才得以详细研究。与大多数典型的真核生物一样，酵母染色质上有4个核心组蛋白，H2A，H2B，H3和H4。每种组蛋白在基因组中有两个不相连的基因座（如：H3组蛋白由*HHT1*和*HHT2*编码），任何一个基因座都足以维持生存。奇怪的是，编码组蛋白H3的每个基因都与一个组蛋白H4基因紧密连锁（如：*HHT1*与*HHF1*在染色体上紧密相邻），组蛋白H2A和H2B有类似的情况。在本试验中，将利用这种特性分离*HHT2*和*HHF2*基因连锁的两种不同突变型。

不仅组蛋白基因的温度敏感突变已经报道（Smith et al. 1996），而且对影响基因活性的组蛋白等位基因也已分离，如半乳糖代谢所必需的基因（Durrin et al. 1991，Mirschhorn et al. 1995）。我们将使用质粒改组方法分离温度敏感型和半乳糖等位基因*HHT2*和（或）*HHF2*的缺陷型。

菌株

7-2 UCC1118 *MATα ade 2Δ∴ hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 Ura3Δ0 Δhhf2-hht2 ∴ MET15 ΔHHF1-hht1 ∴ LEU2* [*pRM200U*（*URA3 CEN ARS HHF2-HHT2*）]

质粒

pMP3 一个含有*TRP1*和*HHT2-HHF2*的着丝粒载体

程序

第1天

将菌株7-2在YPD平板上划线，在30℃下培养。

第3天

挑一个丰满的菌株7-2菌落，接种到5ml YPD培养液，在30℃下培养过夜。

第4天

使用血球计数板（见附录G）测定5ml菌株7-2培养物的细胞密度。用50ml YPD培养液稀释到5×10^6细胞/ml，在30℃下培养达两次分裂（约4小时）。

按照“技术和方案1，酵母的高效转化”方法收获细胞，用100ng诱变的pMP3质粒进行转化（提供的母液用“技术和方案6，质粒DNA的羟胺诱变”方法制得）。必须包括一个不加DNA的阴性对照。把转化细胞悬浮在2.4ml的无菌水里，吸出0.4ml稀释到2ml，再从中取0.2ml涂HC－trp平板，用浓细胞悬液涂10个平板，用稀释细胞液涂另外10个平板。把0.2ml不加DNA的阴性对照浓细胞涂在一个平板上。所有21个平板都在室温（23℃）下培养。

第 8 天

选择 10 个转化平板，理想情况下，每个平板有 100～300 个菌落，计菌落总数。把 10 个转化平板分别影印到 3 个 5-FOA 平板上，一个 5-FOA + 3% 半乳糖和一个 HC－trp 平板。室温培养每个转化子的 5-FOA 影印平板，在 30℃下培养另外一个 5-FOA 平板和 5-FOA + 3% 半乳糖平板，在 37℃下培养最后一套 5-FOA 影印平板和 HC－trp 平板。

第 10 天

统计 37℃下影印平板的温度敏感型候选菌落。从 5-FOA 平板上挑 12 个温度敏感型候选菌落室温培养，再划线到 YPD 平板室温培养纯化（至多使用 3 个 YPD 平板）。

第 12 天

1）计算 30℃下影印平板（来自第 8 天）的 gal^- 菌落，从 5-FOA 平板挑 12 个 gal^- 候选菌落，划线在 YPD 平板上，在 30℃下培养纯化（至多使用 3 个 YPD 平板），注意任何 gal^- 菌落都可能是温度敏感型。
2）在 YPD 平板上重新测试纯化的温度敏感型候选菌落（来自第 10 天）把每个平板影印到两个 YPD 平板上，一个室温培养，另一个在 37℃下培养。

第 14 天

1）重新测试纯化的 gal^- 候选菌（来自第 12 天）。影印每个平板到一个 YPD 平板和一个 YEPGal 平板，在 30℃下培养。
2）统计已重新测试的温度敏感型候选菌，确定温度敏感型质粒转化子的频率。

第 16 天

统计重新测试的 gal^- 候选菌，确定整个班的转化子频率。

材料

第 1 天

1 套 YPD 平板

第 3 天

1 支含有 5ml YPD 的培养试管

第 4 天

“技术和方案 1，酵母的高效转化”方法中所需的材料
诱变的 pMP3 DNA
含有 50ml YPD 的三角瓶
21 套 HC－trp 平板

第 8 天

30 套 5-FOA 平板
10 套 HC－trp 平板
10 套 5-FOA＋3％半乳糖平板
无菌绒垫

第 10 天

3 套 YPD 平板

第 12 天

9 套 YPD 平板
无菌绒垫

第 14 天

3 套 YPD 平板
3 套 YEPGal 平板
无菌绒垫

参 考 文 献

Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulous, A. Deanouel, F. LaCroute, and C. Cullin. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 21: 3329～3330.

Boeke, J. D., J. Trueheart, G. Natsoulis, and G. R. Fink. 1987. 5-Fluoro-orotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enymol*. 154: 164～175.

Brachmann. C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J. D. Bieke, 1997. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications *Yeast* (in press).

Durrin, L. K., R. K. Mann, P. S. Kayne, and M. Grunstein. 1991. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in *vivo*. *Cell* 65: 1023～1031.

Hirschhorn, J. N., A. L. Bortvin, S. L. Ricupero-Hovasse, and F. Winston. A new class of histone H2A mutations in *Saccharomyces cerevisiae* causes specific transcriptional defects in *vivo*. *Mol*. *Cell*. *Biol*. 15: 1999～2009.

Lorenz, M. C., R. S. Muir, E. Lim, J. McElver, S. C. Weber, and J. Heitman. 1995. Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 158: 113～117.

Rose, M. D. 1987. Isolation of genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol*. 152: 481～504.

Rothstein, R. J. 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101: 202～211.

Scherer, S. and R. W. Davis. 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. 76: 4951～4955.

Smith, M. M., P. Yang, M. S. Santisteban, P. W. Boone, A. T. Goldstein, and P. C. Megee. 1996. A novel histone H4 mutant defective in nuclear division and mitotic chromosome transmission. *Mol*. *Cell*. *Biol*. 16: 1017～1026.

实验八　*ras2* 抑制基因的分离

抑制基因 *RAS1* 和 *RAS2* 与 G 蛋白非常相似，都能激活酵母体内的腺苷酸环化酶。cAMP 对细胞生长和进入有丝分裂周期是必需的，通过对细胞生长有关问题的大量遗传学分析，对 cAMP 信号传导途经的成分和它们的生化作用已有了很好的了解（Broach 1991）。本实验将按照 Cannon 等（1986）的方法分离 *ras2* 无效突变的抑制基因。

在大多数情况下，*ras1* 或 *ras2* 单突变株是可以很好存活的，一个有功能的 RAS 蛋白质可充分激发腺苷酸环化酶。然而，*ras2* 突变株在非发酵碳源（如乙酸或甘油）上生长是有缺陷的。原因是 *RAS1* 的表达在这样的生长培养基里受到抑制，因此，一个 *ras2* 无效突变引起一个条件表型，利用这个表型我们可以确证 *ras2* 抑制基因。

菌株

8-6　1784TRP　*MATα RAS2 his4 ura3 leu2 can1*
8-7　AMP141　*MAT***a** *ras2-530∴ LEU2 his4 ura3 leu2 trp1 can1*
8-8　AMP142　*MATα ras2-530∴ LEU2 his4 ura2 leu2 lys2 can1*

程序

第 1 天

指导老师已经在 YPD 平板上划出了你的 *ras2* 突变株（菌株 8-7 供 1、2、3、4 组使用，菌株 8-8 供 5、6、7、8 组使用）。用 YPD 平板，接 30 到 40 个单菌落作为原始平板，在 30℃下培养。冷藏一个划线平板作为未来的亲本菌株来源，从相邻实验组获得相对应的划线菌株（菌株 8-8 对 1、2、3、4 组，菌株 8-7 对 5、6、7、8 组），冷藏备用。

第 2 天

将 YPD 平板影印到 YPAc 平板上，轻轻地影印使背景生长减少到最小限度，给指导老师一个影印平板供紫外线处理（置 Stratalinker，75μl），两平板在 30℃下培养。

第 6 天

可见成批的小菌落（papillae）长出。从经紫外线处理或未经处理的平板中挑取单个菌落转接到一个新鲜 YPD 原平板，小心挑取以免周围细胞的污染（正规的方法将通过单菌落划线纯化小菌落，为了节约时间省略这些步骤）。每批编号，并记录小菌落来自哪个平板，包括不同批的亲本菌株和在原平板的 *RAS2* 对照菌株 8-6，在 30℃下培养。

第 7 天

涂一个相对杂交型的 *ras2* 菌株（菌株 8-8 对 1、2、3、4 组；菌株 8-7 对 5、6、7、8 组）的 YPD 平板，将 YPD 原平板上的培养体影印到两个 YPAc 平板上，两个 YPD 平板和涂了 *ras2* 的平板，一对 YPAc/YPD 平板在 30℃下培养，其他在 37℃下培养。那些杂交平板在 30℃下培养。

第 8 天

观察并记录 30℃和 37℃的菌落生长情况，保存这些平板备第 12 天使用。选择自己欲做详细分析的 12 个回复突变型（revertants），把这 12 个回复突变型与培养在 SC－lys－trp平板上的 *ras2* 供试菌株交叉划线，同时也把 *ras2* 亲本与 *ras2* 供试菌交叉划线，每个平板可以划四个交叉平板置 30℃下培养。

第 10 天

从每个 SC－lys－trp 划线的平板挑两个单菌落，用牙签接种到 YPAc 和 YPD 平板，包括一个与 *ras2* 亲本杂交的菌落，在 30℃下培养。

第 12 天

观察记录 YPD 和 YPAc 平板的生长情况，以判定哪些抑制因素是显性的，哪些是隐性的。取出第 8 天的 YPD 平板，制备两个划线 YPD 原平板，每个都含有 *ras2* 亲本和 4 个隐性抑制基因菌株，在 30℃下培养。

第 13 天

影印每个划线原平板到两个 YPD 平板上，再影印其他组相对应杂交型的划线原平板到你的影印平板上，在 30℃下培养。

第 14 天

影印交叉划线的原平板到 SC－lys－trp 平板上，在 30℃下培养。

第 15 天

从划线的交叉点挑取细胞，制备一批 SC－lys－trp 原平板。

第 16 天

影印第 15 天的原平板到 YPAc 和 YPD 平板上，在 30℃下培养。

第 17 天

记录和分析第 16 天的划线杂交原平板，你希望从不能互补的抑制基因获得什么样的表型？你的突变株与邻组的突变株是相同互补群吗？有多少互补群？

材料

第 1 天

1 套 YPD 平板
牙签

第 2 天

2 套 YPAc 平板
无菌绒垫

第 6 天

1 套 YPD 平板
牙签

第 7 天

4 套 YPD 平板
2 套 YPAc 平板
无菌绒垫
牙签

第 8 天

8 套 SC－lys－trp 平板
牙签

第 10 天

牙签
1 套 YPAc 平板
1 套 YPD 平板
无菌绒垫

第 12 天

2 套 YPD 平板
牙签

第 13 天

4 套 YPD 平板
无菌绒垫

第 14 天

4 套 SC－ lys－trp 平板
无菌绒垫

第 15 天

1 套 SC－lys－trp 平板
牙签

第 16 天

1 套 YPAc 平板
1 套 YPD 平板
无菌绒垫

感谢 Rey Sia 设计本实验

参 考 文 献

Broach, J. R. 1991. RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Signal transduction in search of a pathway. *Trends Genet*. 7: 28～33.

Cannon, J. F., J. B. Gibbs, and K. Tatchell. 1986. Suppressors of the *ras2* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 113: 247～264.

实验九　细胞型操作

酿酒酵母能够进行有性生殖，单倍体细胞之间能相互交配产生二倍体细胞，然后二倍体细胞进行减数分裂再产生单倍体细胞。交配能力是由细胞的交配型决定的，相同交配型的细胞不能交配，而不同交配型的细胞可以交配。不同交配型是由 *MAT* 基因座等位基因的表达来决定的。一种交配型的细胞具有 *MATα* 等位基因，称为 α 细胞；相反，交配型细胞具有 *MAT*a 等位基因，称为 a 细胞。所以，α 细胞能与 a 细胞进行交配产生既含有 *MATα*，又含有 *MAT*a 等位基因的二倍体细胞，这种二倍体细胞称为 a/α 细胞。

根据交配型的稳定性可以将菌株分为两组，即同宗配合型（homothallic）与异宗配合型（heterothallic）。异宗配合型菌株的交配型是稳定的，而同宗配合型单倍体菌株的交配型是不稳定的，能够发生交配型的改变。所以，一个来自同宗交配型细胞的菌落将同时含有 a 和 α 细胞以及 a 和 α 细胞交配产生的二倍体细胞。

同宗交配型菌株与异宗交配型菌株间孢子杂交的结果表明，同宗与异宗之间的区分仅由一个单独的遗传座位决定，这个座位命名为 *HO*（Winge and Roberts 1949，Takahashi et al. 1958）。已经证明，一个同宗交配型细胞是在其细胞系的早期由一种交配型转变为另一种交配型的（Strathern and Herskowitz 1979）。

各种遗传分析证实了同宗交配现象相关的另外两个基因座的存在（Takahashi 1958；Takano and Oshima 1967；Oshima and Takano 1972），这些基因座命名为 *HML* 和 *HMR*，并发现它们与 *MAT* 基因座同在第Ⅲ染色体上（如图 9.1 所示）。

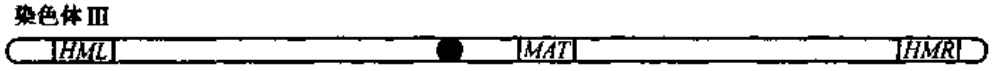


图 9.1　沉默基因座 *HML* 和 *HMR* 与 *MAT* 基因座在染色体Ⅲ上的相对位置

已经证明，*HML* 和 *HMR* 含有 *MAT* 基因座遗传信息的沉默拷贝。通常，*HML* 含有 α 细胞型信息，*HMR* 含有 a 细胞型信息。*HO* 已被证明编码一种位点特异性内切核酸酶，该内切核酸酶只切割 *MAT* 基因座中的一个特异位点，DNA 双链发生断裂后，才可在 *MAT* 基因座与 *HML* 或 *HMR* 之间进行重组。通常，重组发生在含有与 *MAT* 相反交配型信息的沉默基因座处。由于这种重组不是交互的，因此，来自沉默基因座的信息保持不变，而 *MAT* 基因座处的信息则发生改变。从这些观察结果中总结出了解释交配型转换的匣子模型（如图 9.2 所示）。

本实验将要使用：①*HO* 形成二倍体，②二步法基因置换技术转换菌株的杂交型。

实验九（a）　采用 *HO* 产生二倍体

在本节中，用一个含有 *HO* 的质粒转化一个单倍体菌株产生二倍体。此程序可让

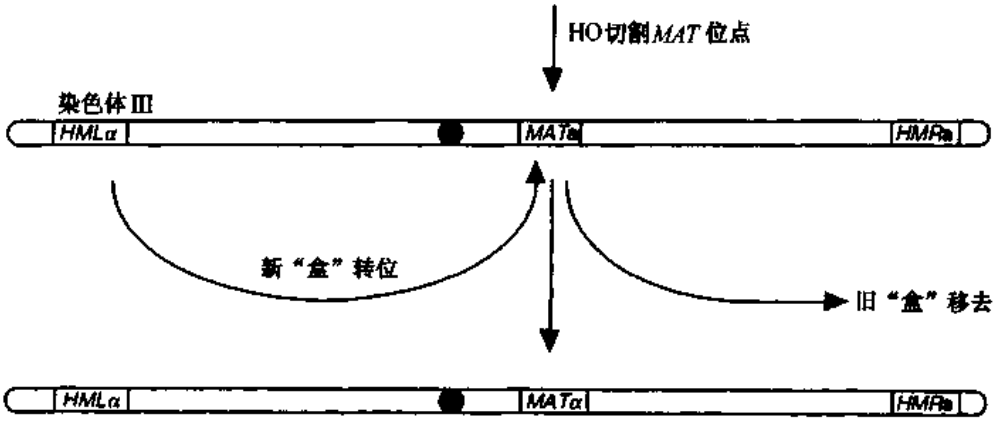


图 9.2　交配型转换的"盒"式模型
（在这种情况下，α 信息置换了 *MAT* 基因座的 a。）
（引自 Herskowitz 和 Oshima [1981]，194 页）

同源基因 α 和 a 单倍体与 α/a 二倍体细胞型得以快速纯化。

菌株

9-1　CKY8　　*MATα ura3-52 leu2-3，112*
9-2　AAY1017　*MATα his1*
9-3　AAY1018　*MAT*a *his1*
注意：菌株 9-2 和 9-3 对测定交配型是很有用的，但其遗传背景还不知道。因此，这些菌株除了用于交配型测试外从不用于基因杂交实验。

质粒

pCY 204　　在 YCp50 中含有 *HO*，选择标记是 *URA3*（图 9.3）

程序

第 1 天

把 9-1 菌株接种到一个 YPD 平板上，在 30℃下培养。

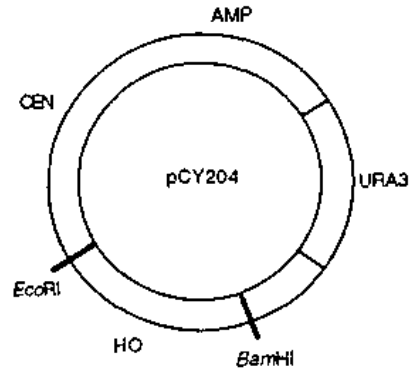
上午，把菌株 9-1 的菌落接种到 5ml YPD 培养液中，在 30℃下培养。将 YPD 平板置于 4℃下贮存以备第 11 天使用。

第 2 天

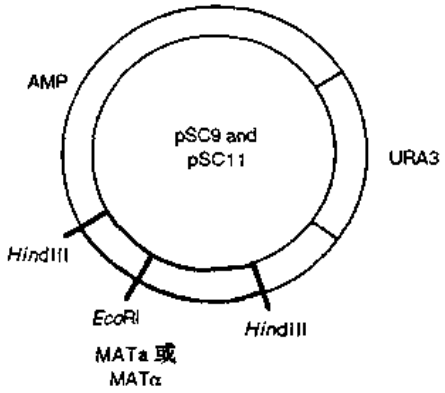
按"技术和方案 1，酵母的高效转化"方法，将未切的质粒 pCY204 转化到菌株 9-1，将转化液涂 SC－ura 平板，在 30℃下培养。记住设置一个不含 DNA 的转化对照。

第 5 天

将 5 个转化子单菌落划线到 SC－ura 平板上，在 30℃下培养。



在 YCp50 的 *Bam*HⅠ-*Eco*RⅠ位点上插入 *HO* 的 *Bam*HⅠ-*Eco*RⅠ片段，获得 pCY204。*HO* 片段含有调节区和 *HO* 的编码区（Russell et al. Molecular and Cellular Biology 1986，6：4281～4294）。



将含有 *MATa* 或 *MATa* 的 *Hind*Ⅲ DNA 片段插入到一个缺失功能的 pRS306 质粒的 *Eco*RI 位点，分别获得 pSC9 和 pSC11。用 *Eco*RI 酶解可激发质粒整合到 *MAT* 基因座（Chu and Herskowitz，unpublished；Sikorski and Heiter，*Geneties* 1989，122：19～27）。

图 9.3　实验九（a）和（b）部分中的质粒

第 7 天

用每个转化子的单菌落接种 5ml 的 YPD，在 30℃下培养。

第 8 天

用血球计数板测定细胞密度，用无菌蒸馏水适当稀释到每 100μl 体积含有 10^5 和 10^6 个细胞，涂 5-FOA 平板。对 *URA3* 基因进行反筛选以便使已经丢失了 pCY204 的细胞能够生长，将剩下的 YPD 培养物保存于 4℃以供第 11 天使用。

第 11 天

将每个转化子的 9 个 5-FOA^R 菌落接到 YPD 平板（共 45 个）制备一批原平板，包括亲本菌株 9-1。另外，从第 7 天培养的 5 个中间培养物中分别取 3μl 点到原平板上，在 30℃下培养此 YPD 平板。将菌株 9-2 和 9-3 分别接两管 5ml YPD 培养液，在 30℃下振荡培养。

第 12 天

分别用 100μl 菌株 9-2 和 100μl 菌株 9-3 涂 SD 平板，待平板表面凉干后，将原平板

影印到 SD 平板上。每一个平板都用新的绒垫以防平板间的污染。同时将原平板影印到一个产孢平板和一个 SC－ura 平板上。

第 14 天

观察并记录交配能力和在 SC－ura 平板上的生长情况。

第 16 天

考察孢子形成能力。

材料

第 1 天

1 套 YPD 平板
1 支盛有 5ml YPD 的培养管

第 2 天

“技术与方案 1，酵母的高效转化”方法中所用的材料
未切的质粒 pCY204
2 套 SC－ura 平板

第 5 天

5 套 SC－ura 平板

第 7 天

5 支各盛有 5ml YPD 的培养管

第 8 天

无菌水
10 套 5-FOA 平板

第 11 天

1 套 YPD 平板
2 支各盛有 5ml YPD 的培养管

第 12 天

无菌绒垫
1 套产孢平板
1 套 SC－ura 平板

实验九（b）　用两步基因置换法进行交配型转换

利用两步基因置换法可以使某基因的一种等位基因被另一种等位基因置换（参见实验七），该技术通常用于一种无选择表型的突变等位基因置换一种野生型等位基因。这种方法的第一步是整合一个含有可选择标记和目标基因序列的质粒，这种整合可实现目标基因的重复，同时两个重复基因被一段质粒隔开（如图 9.4A 所示）。

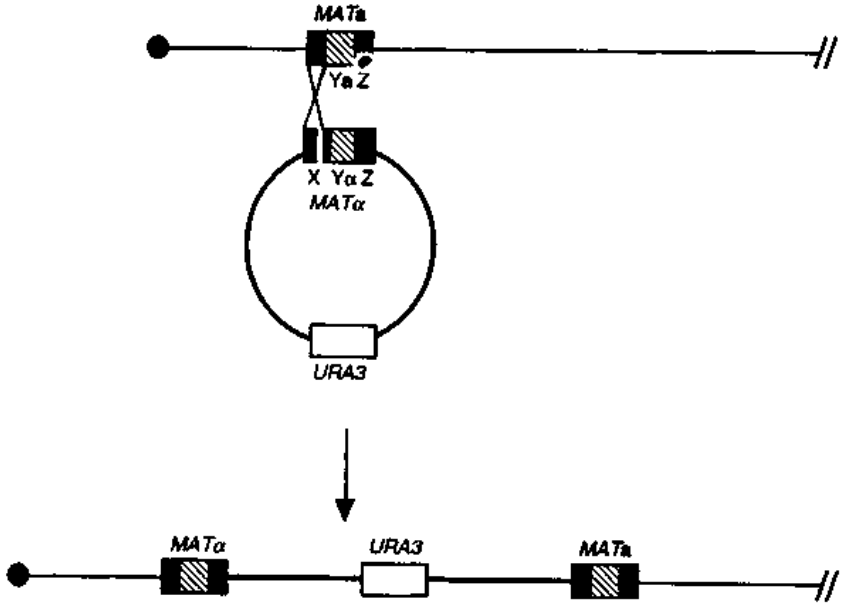


图 9.4A　两步基因置换法。第一步：在重复位点 X 或 Z 处，通过同源重组将质粒整合入染色体，与一步法置换不同的是整个质粒都发生整合。注：两个等位基因相对顺序取决于交换的位置，在这个图中，决定交配型的序列发生在交换体的 3′端。

第二步是通过重复区段内的同源重组去掉质粒序列。如果用来整合的标记能被反筛选，则质粒非常容易去除。例如，使用 5-FOA 反筛选 *URA3*。根据重组发生的位置，剩下的拷贝只带有两个等位基因中的一个（如图 9.4B 所示）。在本实验中，将使用二步基因置换法转换交配型。

菌株

9-4　YSC006　*MATα ura3 ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3, 112 his3-11, 15* [*psi*$^+$] *GAL*$^+$

9-5　YSC005　*MATa ura3 ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3, 112 his3-11, 15* [*psi*$^+$] *GAL*$^+$

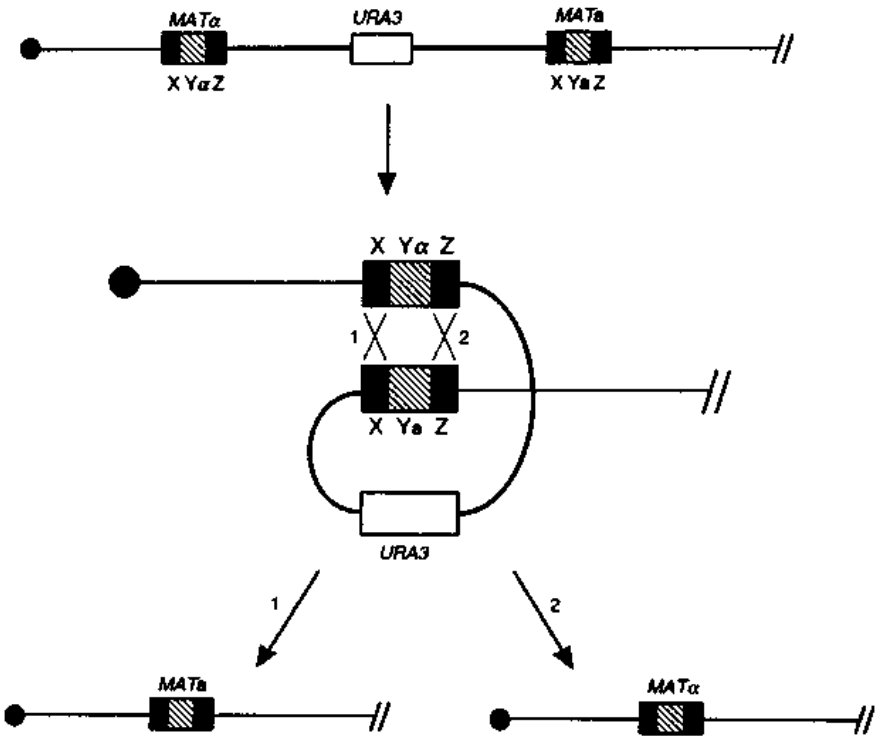


图 9.4B 两步基因置换法（续）。第二步：在 *MAT* 基因座（X 或 Z）之间通过“成环”发生同源重组，交配型转换成 *MAT*α 或恢复成亲本基因座（*MAT*a）依赖于重组发生的位点（X 或 Z），在这种情况下，反筛选（针对 *URA3*）整合体可通过涂 5-FOA 平板进行。

质粒

pSC 9　*MAT*α 插入到 pRS306 质粒，选择标记是 *URA3*（图 9.4）
pSC 11　*MAT*a 插入到 pRS306 质粒，选择标记是 *URA3*（图 9.4）

程序

第 1 天

将菌株 9-4 和 9-5 接种到一个 YPD 平板上，在 30℃下培养。

1、2、3、4 组使用菌株 9-4；5、6、7、8 组使用菌株 9-5。

上午，将单菌落接种到 5ml YPD，在 30℃下培养，之后将以上 YPD 平板保存于 4℃，待第 11 天使用。

第 2 天

按照“技术与方案 1，酵母的高效转化”方法，转化菌株 9-4 和 9-5。从指导老师那里获得酶解质粒 DNA，用 pSC11 转化菌株 9-4，用 pSC9 转化菌株 9-5，将转化混合物涂于 SC－ura 平板，在 30℃下培养，别忘了做一个不加 DNA 的转化对照。

第 5 天

将 5 个转化子在 SC－ura 平板上划线，30℃下培养，以获得单菌落。

第 7 天

将每个转化子的单菌落接种到 5ml YPD，在 30℃下培养。

第 8 天

用血球计数板测定细胞密度（见附录 G），用无菌蒸馏水将细胞适当稀释。用每 100μl 体积含 10^5 至 10^6 细胞的菌液涂 5-FOA 平板。此平板将用于选择插入到 *MAT* 基因座复制区的 *URA3* 基因。通过同源重组，*URA3* 基因的“突环”形成过程产生了 5-FOA^R。剩下的 YPD 培养物于 4℃下保存待第 11 天使用。

第 11 天

从每个转化平板上挑 9 个 5-FOA^R 菌落点接到 YPD 平板上，制备一批原平板（共 45 个）同时也接亲本菌株 9-4 和 9-5（从第 1 天保存于 4℃下的平板得到一个亲本菌株，另一亲本菌株可从邻组得到）。另外，从第 8 天的 5 个中间培养物中各取 10μl，点接到原平板的菌团上，将 YPD 平板置 30℃培养。

第 12 天

将 100μl 菌株 9-2 涂于 SD 平板上（来自实验九［a］的第 11 天），让其干燥，用菌株 9-3 涂另外一个 SD 平板，重复以上过程，用绒垫将原平板上的菌团影印到上述两个 SD 平板上，每个平板都使用新的绒垫以免平板间的污染，同时将原平板影印到一个产孢平板和一个 SC－ura 平板上。

第 14 天

考察交配能力和在 SC－ura 平板上的生长情况。

第 16 天

考察孢子形成能力。

材料

第 1 天

2 套 YPD 平板
1 支装有 5ml YPD 的培养管
盛有 100ml YPD 的锥形烧瓶

第 2 天

“技术与方案 1，酵母的高效转化”方法中所需的实验材料

酶解的质粒 pSC9 和 pSC11 DNA
2 套 SC－ura 平板

第 5 天

5 套 SC－ura 平板

第 7 天

5 支盛有 5ml YPD 的培养管

第 8 天

无菌蒸馏水
10 套 5-FOA 平板

第 12 天

1 套 YPD 平板
1 套产孢平板
1 套 SC－ura 平板

第 13 天

无菌绒垫
2 套 SD 平板

此实验由 Dana Davis 设计和撰写。

参 考 文 献

Herskowitz, I. and Y. Oshima. 1981. Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: Mating type and mating－type interconversion. In The *molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance* (ed. J. N. Strathern et al.), pp. 181～209. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Hicks, J. B. and I. Herskowitz. 1977. Interconversion of yeast mating types. II. Restoration of mating ability to sterile mutants in homothallic and heterothallic strains. *Genetics* 85: 373.

Klar, A. J. S., S. Fogel, and D. N. Radin. 1979. Switching of a mating－type a mutant allele in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 92: 759.

Oshima, Y. and I. Takano. 1972. Genetic controlling system for homothallism and a novel method for breeding triploid cells in *Saccharomyces*. *Fermentation Technology Today* 847.

Russell, D. W., R. Jensen, M. J. Zoller, J. Burke, B. Errede, M. Smith, and I. Herskowitz. 1986. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* HO gene and analysis of its upstream regulatory region. *Mol. Cell. Biol.* 6: 4281～4294.

Sikorski, R. S. and P. Hieter, 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19～27.

Strathern, J. N. and I. Herskowitz. 1979. Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: The switching pattern of homothallic yeast. *Cell* 17: 371～381.

Strathern, J. N. L. C. Blair, and I. Herskowitz. 1979. Healing of mat mutations and control of mating type interconversion by the mating type locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 3425.

Takahashi, T. 1958. Complementary genes controlling homothallism in *Saccharomyces*. *Genetics* 43: 705.

Takahashi, T., H. Saito, and Y. Ikeda. 1958. Heterothallic behavior of a homothallic strain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 43: 249～260.

Takano, I. and Y. Oshima. 1967. An allele specific and a complementary determinant controlling homothallism in *Saccharomyces oviformis*. *Genetics* 57: 875.

Winge, Φ. and C. Roberts. 1949. A gene for diploidization in yeast. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.* 24: 341～346.

实验十　用插入穿梭诱变法分离端粒沉默抑制基因

真核生物基因组根据其结构和功能的不同而组成不同的区段。在整个细胞周期始终处于凝缩状态的这样一类结构区域称为异染色质，与其相伴存在的常染色质在细胞分裂间期从外表上看则呈弥散状态。染色体的区段也因其功能不同而存在差异，因为真核基因在染色体上的位置不同其表达结果也大不相同。在许多真核生物中已经观察到这种染色体位置效应现象（见综述 Lima-de-Faria 1983）。当基因重排使基因组的常染色质区段位于或靠近异染色质时，发生了移位的常染色质基因的表达就会在许多细胞中发生改变：基因在一些细胞中表达而在另一些细胞中则不表达，因此，就会产生一种镶嵌或花斑表型（variegated phenotypic pattern）。

已经证明，在酿酒酵母中有 4 个染色体区域可以产生位置效应：rDNA 基因座、*HML*、*HMR* 和端粒（Loo and Rine 1995，Bryk et al. 1997，Smith and Boeke 1997）。靠近或位于这些结构域内的基因会停止转录并表现出花斑表型。酿酒酵母的端粒沉默可能是由一种抑制染色质结构引起的，这种结构起始于染色体末端并沿着 DNA 向内伸展。已经鉴定出与端粒沉默有关的许多基因产物，包括组蛋白 H3 和 H4。然而，有一点是清楚的，即目前所收集到的对端粒染色质结构和组织起重要作用的基因只是全部所需基因的一小部分。

筛选端粒沉默抑制基因

在本实验中，将进行遗传筛选，通过在一种酵母菌中分离抑制端粒沉默的突变体来鉴定与端粒沉默有关的其他基因，这个酵母菌株是用位于两个端粒基因座的遗传标记构建起来的（Singer and Gottschling 1994）。腺嘌呤生物合成所需要的 *ADE2* 基因位于靠近染色体Ⅴ右臂端粒处，尿嘧啶生物合成所需要的 *URA3* 基因则位于靠近染色体Ⅶ（Ⅶ-L）左臂端粒处。一般而言，*ADE2* 基因表达的菌落为白色，而 *ADE2* 基因不表达的菌落（*ade2*）为红色（Roman 1956）。由于绝大多数基因的端粒沉默具有半稳定特性，每隔几代就会发生停止转录和激活转录状态之间的转换，从而产生不同表型的群体。对 *ADE2* 靠近端粒的菌株而言，这些群体在一个单独的菌落中呈现出红色和白色的部分（Gottschling et al. 1990）。位于Ⅶ-L 端粒处的 *URA3* 基因在通常情况下也会发生转录状态的改变。但是，在这种菌株中如果删除其反式激活因子 *PPR1*（Aparicio and Gottschling 1994），端粒处的 *URA3* 基因就会被完全抑制，因此，这种细胞就不能在缺乏尿嘧啶（Ura^-）的环境下生长。

通过诱发该菌株发生突变，然后鉴定出那些从不抑制端粒标记的细胞，即那些在缺乏尿嘧啶（Ura^+）环境下能够生长且使白色菌落占优势（Ade^+）的细胞，就可以筛选出端粒沉默抑制基因。本实验采用“插入穿梭诱变”的方法，这是一种十分有效的在酿

酒酵母中快速鉴定突变基因的方法（Seifert et al. 1986，Burns et al. 1996）。它利用了酵母的高效同源重组系统及相对较小的基因组（单倍体 DNA 长度为 1.2×10^7bp）的优点。

插入穿梭诱变是建立在酵母∷mTn*3* 文库基础上（Seifert et al. 1986）。用一个大肠杆菌载体构建起一个庞大的含有 10^5 重组子（相当于 20 个酵母基因组）的酵母基因组文库，在酵母基因组片断侧翼存在 *Not* I 限制性酶切位点。用 Tn*3* 衍生转座子诱变这个文库，Tn*3* 衍生转座子含有一个位于 Tn*3* 侧翼 38bp 反向重复的酵母选择标记。从这个诱变文库中制备 DNA，并用 *Not* I 切割，从载体中释放出 mTn*3* 诱变酵母 DNA。这些线性 DNA 片断再被转化进入一个带有酵母筛选标记的合适菌株中以鉴定出整合重组子。

在本研究中，Tn*3* 衍生转座子含有酵母的 *LEU2* 基因作为可选择标记以及与 Tn*3* 38bp 反向重复序列紧密相连的无起始密码的细菌 *lacZ* 基因。有 1/6 的基因由于 Tn*3* 的插入可与 *lacZ* 形成翻译融合体。这些融合体能够成为补充分析酵母目标基因的有用工具，该实验中将对这些融合体进行筛选。

有两种鉴定突变基因的方法，都利用了插入 mTn*3* 转座子，其中一种是利用一个从酵母转移到大肠杆菌的质粒来营救转座子和侧翼的酵母 DNA（Burns et al. 1996）。在本实验中，将使用反向 PCR 来扩增 mTn*3* 侧翼的酵母序列（Ochman et al. 1990）。

菌株

10-1　UCC3505　*MATα ura3-52 lys2-801 ade2-101 leu2-Δ1 his3-Δ200 Δppr1∴ LYS2 adh4∴ URA3-TEL-VIIL ADE2-TEL-VR*

程序

安全须知：液氮温度是－185℃，请小心谨慎使用，戴耐热手套和面罩以防灼烧。

第 1 天

用菌株 10-1 在 YPD 平板上划线以获得单菌落，置 30℃下培养 2 天。

第 3 天

挑一个生长旺盛的菌株 10-1 菌落接种 5ml YPD 培养液，置 30℃下培养过夜。

第 4 天

使用血球计数板（见附录 G）检测 5ml 菌株 10-1 培养物的细胞密度，在一个装有 50ml YPD 的锥形烧瓶中稀释细胞至 5×10^6 细胞/ml，置 30℃培养生长达两次分裂（约 4 小时）。并按“技术和方案 1，酵母的高效转化”方法，收获细胞，用 9μg 的 *Not* I 酶解的 mTn*3*-*lacZ*-*LEU2* 基因组文库 DNA 进行转化（母液是 0.2μg/μl），每次转化用 1μgDNA，转化 9 次，做一个不加 DNA 的转化作为阴性对照。将每次转化处理的细胞

均分为三等份，涂 3 个 HC－leu 平板，置 30℃培养 2 天。

第 6 天

测定 Leu^+ 转化子数，将每个 HC－leu 平板影印到 HC－leu－ura 平板上，置 30℃培养 3 天。

第 9 天

挑 20 个独立的 Ura^+ 白色菌落（至少不非常红）在 HC－ura 平板上划线培养，每平板划 4 个菌落，至多使用 5 个平板，置 30℃下培养 2 天。

第 11 天

测定通过重试属 Ura^+ 和白色（不是粉红色）的转化子总数，挑出每个转化子，接种到两个 YPD 平板上，置 30℃下培养 1 天。另外，计算产生 Ura^+ 白色菌落的 Leu^+ 转化子的百分数，即突变发生的频率。

第 12 天

1）取一套 YPD 平板，把它影印到一个洁净的在培养基表面铺有无菌 3MW 滤纸的 YPD 平板上，置 30℃下培养过夜。
2）检查其他平板(原平板)，挑 6 个单菌落分别接种到 5ml YPAD 培养液。选择在 HC－ura 培养基上长得好的不呈粉红或红色的菌落，这些培养物将用于分离基因组 DNA。

第 13 天

1）用镊子小心从 YPD 平板上取出 3MW 滤纸，在液氮中浸泡 1 分钟（**注意，需戴耐热手套和护目镜以防灼伤**），取出滤纸，让其完全融化，然后，再用液氮浸泡一次，待滤纸第二次解冻后，将细胞朝上轻轻地铺到 X-gal 平板上，置 30℃下保温，每小时检查一次平板（包括当天课外），注意观察细胞的蓝色显色反应。
2）按“技术和方案 3D，酵母基因组 DNA：玻珠制备法”，从 6 个细胞培养物中分离基因组 DNA，把最后 DNA 沉淀悬浮于 100μl TE 缓冲液中。

第 14 天

取每种 DNA（来自第 13 天）15μl，用 5～10 单位的 *Rsa* I 在 100μl 总反应体积中酶解（加约 1μg 的 RNaseA 和适量缓冲液进行酶解），置 37℃下保温数小时。

样品在 65℃下保温 20 分钟使酶灭活。

取出 10μl 酶解 DNA，用 T4 DNA 连接酶缓冲液（含 ATP）稀释到终体积 100μl（1×T4 DNA连接酶缓冲液），加约 100 单位的 T4 DNA 连接酶，室温过夜。

第 15 天

用 PCR 扩增邻近 Tn*3* 转座子的 DNA，向 5μl 的连接 DNA 中加入：

4μl　25mmol/L $MgCl_2$

5μl　10× *Taq* DNA 聚合酶缓冲液
1μl　25μmol/L 引物 1
1μl　25μmol/L 引物 2
1μl　10mmol/L dNTPs
33μl　蒸馏水
1μl　*Taq* DNA 聚合酶（2.5 单位）

使用热预处理方法是分离基因组 DNA 的成功关键（在加入 *Taq* DNA 聚合酶反应之前，一定将样品加热到 94℃保温几分钟）。扩增条件为：94℃ 1 分钟，65℃ 1 分钟，72℃ 2.5 分钟，35 个循环。以 72℃保温 7 分钟结束最后一个循环。

除去扩增 DNA 中的蛋白质，寡核苷酸和 dNTPs（用课堂上提供的 Wizard PCR Preps kit）使 DNA 得以纯化，递交 DNA 供测序。

第 16 天

用连接 Internet 网的计算机，输入你的 DNA 序列，与酵母基因组数据库比较，找出你的 DNA 插入位置。

材料

第 1 天

1 套 YPD 平板

第 3 天

1 支含有 5ml YPD 的培养管

第 4 天

含有 50ml YPD 的锥形烧瓶
“技术和方案 1，酵母的高效转化”方法中所需的材料
0.5mg 载体 DNA
9μg *Not* I 酶解的 mTn*3-lacZ-LEU2*
基因组文库 DNA
30 套 HC－leu 平板

第 6 天

30 套 HC－leu－ura 平板
30 个无菌绒垫

第 9 天

5 套 HC－ura 平板

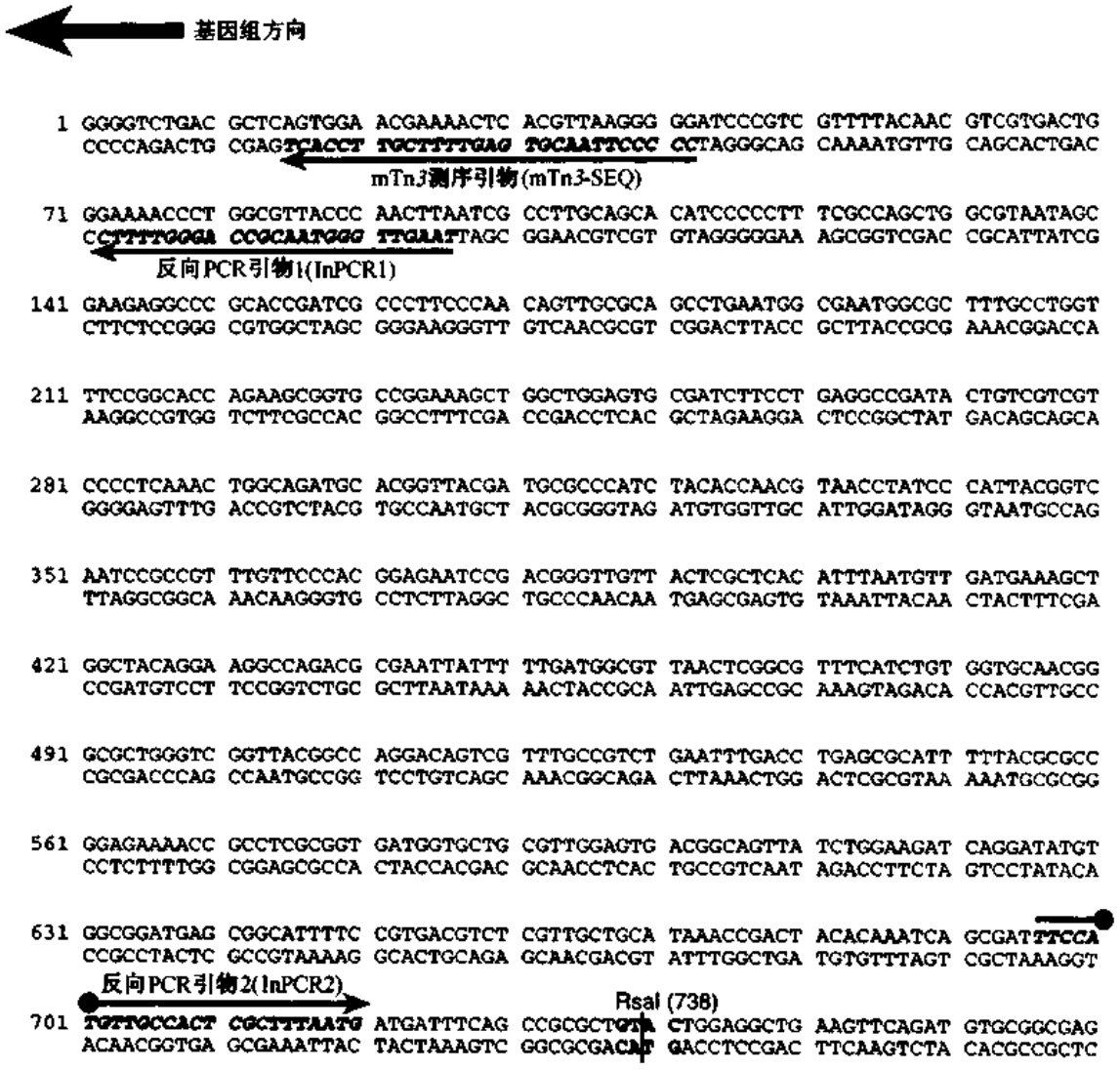


图 10.1　mTn*3*-*lacZ*-*LEU2* 的 β-半乳糖苷酶末端的序列

第 11 天

2 套 YPD 平板

第 12 天

1 套 YPD 平板

1 张无菌 3MW 滤纸（直径 8.2cm）

6 支含有 5ml YPAD 的培养管

第 13 天

液氮

1 套 X-Gal 平板

"技术和方案 3D，酵母基因组 DNA：玻珠制备法"中所需的材料

第 14 天

Rsa I
60μl　10×限制性内切酶缓冲液
5μl　RNaseA (5mg/ml)
60μl　10×T4 DNA 连接酶缓冲液 + ATP
T4 DNA 连接酶

第 15 天

5μl　25mmol/L $MgCl_2$
50μl　10× *Taq* DNA 聚合酶缓冲液
10μl　25μmol/L 引物 1
10μl　25μmol/L 引物 2
10μl　10mmol/L dNTPs
蒸馏水
Taq DNA 聚合酶
Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp. A7170)
带有 mTn*3* 测序引物的 ABI Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystem Inc.)

第 16 天

连网计算机

参 考 文 献

Aparicio, O. M. and D. E. Gottschling. 1994. Overcoming telomeric silencing: A trans-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes Dev*. 8: 1133~1146.

Bryk, M., M. Banerjee, M. Murphy, K. E. Knudsen, D. J. Garfinkel, and M. Jcurcio. 1997. Transcriptional silencing of TY1 elements in the RDN1 locus of yeast . Genes Dev 11: 255~269.

Burns, N., P. Ross-Macdonald, G. S. Roeder, and M. Snyder. 1996. *Methods in Molecular Genetics* 5: 298~308.

Gottschling, D. E., O. M. Aparicio, B. L. Billington, and V. A. Zakian. 1990. Position effect at S. *cerevisiae* telomeres: Reversible repression of PolII transcrption . Cell 63; 75~762.

Lima-de-Faria, A. 1983. *Molecular evolution and organization of the chromosome*, p. 507. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands.

Loo, S. and J. Rine. 1995. Silencing and heritable domains of gene expression. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol*. 11: 519~548.

Ochman, H., M. M. Medhora, D. Garza, and D. L. Hartl. 1990. *PCR Protocols: A GUIDE TO Methods and Applications*, p. 219. Academic Press.

Roman, H. 1956. Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. 21: 175~185.

Singer, M. S. and D. E. Gottschling. 1994. TLC1: Template RNA component of *Saccharomyces cervisiae* telom-

erase. *Science* 266: 404～409.

Seifert, H. S., E. Y. Chen, . So, and F. Heffron. 1986. Shuttle mutagenesis: A method of transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 735～739.

Smith, J. S. and J. D. Boeke. 1997. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* 11: 241～254.

实验十一　双杂合蛋白互作分析法

大多数生物学过程是以蛋白质间互作的方式进行的，并且已经设计出许多生化分析方法来查明这些互作。双杂合系统是一种以酵母为基础的遗传检测技术，它提供了一种查明两种蛋白质间潜在互作简单而灵敏的方法。它是建立在某些真核生物转录激活因子是调节子的基础上。例如，Gal4p，一种 *GAL* 途经的正调控子，是由一个位点特异性 DNA 结合区域和一个酸性转录激活区域组成（Keegan et al. 1986）。这个 DNA 结合区域与一个位于 *GAL* 基因启动子上游激活序列（UAS）相结合，使转录激活区域与其他起始转录的元件发生互作，这两个区域可以分开并且能够以独立的单位发生作用。Fields 和 Song（1989）利用 Gal4p 的这种特征创造了一个系统，在该系统中产生了两种杂合蛋白：一种蛋白与 Gal4p DNA 结合区域结合，另一种则与 Gal4p 转录激活区域结合。结合和激活区域本身不能发生互作，并且当它们在一个酵母细胞中表达时，也不能在 *GAL* 启动子处激活转录。但是，如果与结合和激活区域相融合的序列能够发生互作的话，那么结合和激活区域将在 DNA 上相互靠近，从而形成有功能的转录激活因子。

最简单的情况是，双杂合蛋白互作系统被用来检测两种已知蛋白间的互作，这通常称为直接双杂合（directed two-hybrid）。一种改进的直接双杂合法被用来鉴定目标蛋白质突变形式的互作能力，此外还可以鉴定出互作所需要的区域。双杂合系统的另一种用途是从一个随机基因组或 cDNA 文库中鉴定互作的蛋白质。在这种情况下，目标蛋白质基因与 DNA 结合区域相融合，随机基因组或 cDNA 片断与激活区域相融合。在本实验中，一种由 Elledge 在原来酵母双杂合系统基础上发展起来的方法被用于检测两种蛋白质 Cin2p 和 Cin4p 之间的互作（Harper et al. 1993）。*CIN2* 和 *CIN4* 在酵母中与微管蛋白的功能有关（Hoyt et al. 1990，Stearns et al. 1990），并已证明在双杂合系统中存在互作（Feierbach and Stearns，未发表资料）。

使用具有可以对许多报告基因起作用的 *GAL* 启动子的构件能够分析杂合转录激活因子的活性。在本实验中用的构件含有两个报告基因，它们是 *HIS3*——一个与组氨酸生物合成有关的酵母基因和 *lacZ*——一个合成 β-半乳糖甘酶的细菌基因。*HIS3* 基因可在缺乏组氨酸的培养基上筛选出 His^+ 细胞，*lacZ* 基因可以通过观察含有产生色素的 X-gal 底物的培养基直接看出表达 β-半乳糖甘酶的细胞。根据与 DNA 结合区域杂合的上游结合位点的数目和亲和性的不同以及这些位点与转录起始点的位置不同，起始这些报告基因的启动子会有所不同。这些差异会影响报告基因检测蛋白质互作的强度，*lacZ* 报告基因的活性对功能检测显得较为精确。

要使双杂合法获得成功就必须满足一些条件。首先，两种杂合蛋白质必须能够表达，在一些双杂合载体构件中应含有附加表位（epitope tag），以便可以通过 Western 印迹分析来验证蛋白质基因的表达。其次，任何一种杂合蛋白都不可以单独激活转录，当从一个文库中鉴定互作因子时，有几种可能性会导致假阳性，但并不是对所有情况在机理上都了解得很清楚。为了有助于鉴定出假阳性，就要对来自文库的质粒进行其他的检

测：通过与一些标准测试蛋白比较（通常使用 p53 和核纤层蛋白），首先检测报告基因的自我激活，然后检测目标蛋白互作的专一性。同所有遗传学方法一样，通过双杂合系统检测到的互作还要用生物学或生物化学实验加以确证。

菌株

11-1	Y190	*MATa gal4 gal80 his3-Δ200trp1-901 ade2-101 leu2-3,112 lys2: GAL-HIS3: LYS2 ura3-52: GAL-lacZ: URA3* Cyh^r
11-2	Y187	*MATα gal4 gal80 his3-Δ200 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3, 112ura3-52: GAL-lacZ: URA3*
11-3	TSY801	Y190[pTS434]
11-4	TSY802	Y187 [pTS721]
11-5	TSY803	Y190 [pAS1]
11-6	TSY804	Y187 [pACTII]
11-7	TSY805	Y190 [pTS428]
11-8	TSY806	Y190 [pTS430]

质粒

pAS1	GAL4 DNA-结合区域载体（TRP1 作为选择标记）
pACT11	GAL4 激活区域载体（LEU2 作为选择标记）
pTS434	含有 CIN4 的 pAS1（DNA-结合区域融合）
pTS721	含有 CIN4 的 pACTⅡ（GAL4 激活区域融合）
pTS428	pAS1-p53
pTS430	含核纤层蛋白的 pAS1

程序

安全须知：液氮的温度是－185℃，应谨慎使用，需戴耐热手套和面罩以防灼伤。

第 1 天

根据每个菌株质粒的选择标记，所有菌株接到 SC－leu 和 SC－trp 平板上，置 30℃培养。

第 3 天

为了在同一细胞中表达不同 DNA 结合区域融合蛋白和激活区域融合蛋白，将携带不同质粒的菌株成双交配，通过报告基因活性检测产生的二倍体数。

遗传杂合　按下表组合进行两菌株的杂合，用无菌牙签将两个菌株混合点接在

YPD平板上，置30℃培养过夜。

菌株1	菌株2	选择培养基
11-3	11-4	SD+ade
11-3	11-6	SD+ade
11-4	11-5	SD+ade
11-4	11-7	SD+ade
11-4	11-8	SD+ade

第4天

将每个杂合培养物划线到SD+ade平板筛选二倍体，置30℃培养两天。

第6天

1）将每个二倍体划线到SD+ade+25mmol/L 3-氨基三唑（3-AT）平板上，置30℃培养过夜，测试*HIS3*基因的活性。注意3-氨基三唑是His3p酶的竞争性抑制剂，使His^+选择更具说服力。
2）将每个二倍体接到SD+ade平板，置30℃培养过夜，用于X-gal转膜检测。

第7天

1）检查含有3-AT平板的生长情况，生长率可以证明*HIS3*基因的激活。依据二倍体试验，这个激活能证明是蛋白质间的相互作用或是自身激活。
2）X-gal膜检测：
①用铅笔或园珠笔给45-μm圆形硝酸纤维膜做标记。
②把膜盖放在酵母菌苔上，让其充分湿润，避免在膜和平板间产生气泡。
③把膜小心从平板中取出以免擦抹菌苔，把膜放在液氮中使之渗透细胞（5～10秒钟）。
④小心地从液氮中取出膜，结冻的膜是非常易碎的，把有细胞的一面向上放置在含有1mg/ml X-gal的3ml Z缓冲液浸泡层析纸的平板中。
⑤置30℃保温几分钟（或多达几小时）显蓝色即证明具有β-半乳糖苷酶的活性。

第8天

再次检查AT平板的生长情况

材料

第1天

1套SC－leu平板
1套SC－trp平板

第3天

2套YPD平板

第4天

3套SD+ade平板

第6天

3套SD+ade+25mmol/L 3-AT平板
1套SD+ade平板

第7天

1张硝酸纤维素滤膜（45μm；Schleicher & Schuell BA85）
3ml含有1mg/ml X-gal的Z缓冲液
液氮

参考文献

Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarski, and S. J. Elledge, 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805~816.

Fields, S. and O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245~246.

Keegan, L., G. Gill, and M. Ptashne. 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231: 699~704.

Stearns, T., M. A. Hoyt, and D. Botstein. 1990. Yeast mutants supersensitive to antimicrotubule drugs define three genes that affect microtubule function. *Genetics* 124: 251~262.

Hoyt, M. A., T. Stearns, and D. Botstein. 1990. Chromosome instability mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that are defective in microtubule-mediated processes. *Mol. cell. Biol.* 10: 223~234.

技术和方案篇

技术和方案 1　酵母的高效转化

（摘自 Gietz 和 Schiestl [1995] *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5 [5]：255～269）

1）接种 5ml 液体 YPAD 或 10ml SC，30℃下振荡培养过夜。

2）计数过夜培养物细胞密度，以最终 5×10^6 个/ml 的细胞密度接种 50ml YPAD 培养液。

3）置 30℃，200r/min 振荡培养至 2×10^7 个细胞/ml，通常需要 3～5 小时，该培养物的细胞足够供 10 次转化用。

注意：①重要的是让细胞至少完成两次分裂；②在细胞的 3～4 次分裂期间，转化效率恒定。

4）用 50ml 无菌离心管以 3000*g*（2500r/min）离心 5 分钟，收获细胞。

5）弃培养液，把细胞悬浮在 25ml 无菌水中，再同上离心。

6）弃水，把细胞悬浮在 1ml 的 100mmol/L 醋酸锂（LiAc）中，转悬浮物到一个无菌 1.5ml 离心管。

7）高速离心 5 秒钟沉淀细胞，用微量移液器吸出醋酸锂。

8）悬浮细胞到最终 500μl 体积（2×10^9 个细胞/ml）其中大约含 400μl 的 100mmol/L 醋酸锂。

注意：如果培养物的细胞数量大于 2×10^7 个细胞/ml，将增加醋酸锂的体积以维持 2×10^9 个细胞/ml 的悬浮细胞量。如果培养物的细胞量低于 2×10^7 个细胞/ml，则应减少醋酸锂量。

9）将 1ml 单链担体 DNA 样品煮沸 5 分钟，快速在冰水中冷却。

注意：没必要每次都煮担体 DNA，保持小等份在你的冰盒里，冻熔 3～4 次后，需再煮沸，取出后应保持在冰上。

10）振荡细胞悬浮液，取 50μl 样品加到标记的离心管中，离心沉淀细胞，用微量取样器除去醋酸锂。

11）基本“转化混合液”由下列成分组成，小心按下列顺序加入：

240μl	PEG（50% w/v）
36μl	1.0mol/L 醋酸锂
25μl	单链载体 DNA（2.0mg/ml）
50μl	水和质粒 DNA（0.1～10μg）

注意：按顺序加入是很重要的。应考虑最先加入 PEG 可保护细胞免受高浓度醋酸锂的不利影响。

12）剧烈振荡每个反应管直到细胞完全混匀，通常需要 1 分钟左右。

13）置 30℃保温 30 分钟。

14）置 42℃水浴中热激 20～25 分钟。

注意：最适热激时间随不同酵母而异。如果你需要获得高转化频率，需事先测试最佳时间。

15）以 6000～8000r/min 离心 15 秒，用微量移液器除去转化混合液。

16）吸 0.2～1.0ml 无菌水加到每个反应管中，用移液器上下轻轻抽提以悬浮沉淀。

注意：如果想获得高转化频率，这一步需尽可能温和地操作。

17）用等份的 200μl 转化混合液涂选择平板。

材料和溶液

聚乙二醇（PEG，50% w/v）（分子量 3350，Sigma P 3640）

加水至终浓度 50%（w/v），用 0.45μm 滤膜（Nalgene）进行过滤除菌。也可将 PEG 溶液进行高压灭菌，但一定要小心确保 PEG 溶液处于适当的浓度。此外，重要的是将 PEG 溶液保存于密封容器中，以防水份蒸发导致溶液浓度升高，在转化反应中，只要稍微改变最适浓度（33%），就会减少转化子数。

单链载体 DNA（2mg/ml）

高分子量 DNA（来自沙门氏试验中Ⅲ型脱氧核酸钠盐，Sigma D 1626）

TE 缓冲液（pH8.0）

10mmol/L Tris-HCl（pH8.0）

1.0mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）

1）称 200mg DNA 溶于 100ml TE 缓冲液中。用 10ml 移液管反复上下抽动使 DNA 分散均匀，然后置于磁力搅拌器中剧烈搅拌 2～3 小时直到完全溶解，或将溶液密封，置冷库内搅拌过夜。

2）分装 DNA 样品（每份 100μl 较适宜），置 -20℃ 条件下保存。

3）使用前，每份 DNA 样品放沸水浴中至少 5 分钟，之后置于冰浴中快速冷却。

提示

1）载体 DNA 煮沸后，冷冻，重复使用 3 到 4 次。如果用煮过的载体 DNA，转化效率开始下降时，那么就要重新煮，或用另一份新 DNA 样品。

2）在该方法中用较低浓度（2mg/ml）的载体 DNA 较为适宜，重复性也较好。

3）在早期的方法中，用苯酚/氯仿抽提可确保最大的转化效率。如果所用 DNA 的质量好，就没必要抽提，可事先测试一下 DNA 载体的质量以便决定是否需要进行抽提。

1.0mol/L 醋酸锂（LiAc）母液

用无离子蒸馏水配制 1.0mol/L 母液，过滤除菌，此溶液无需进行标定，但最终 pH 值应在 8.4～8.9 之间。

此方法的最新版本可通过下列网址查得：

http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/human-genetics/gietz/method.html

参 考 文 献

R. D. Gietz and R. H. Schiestl. 1995. Transforming yeast with DNA. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5 (5): 255～269.

技术和方案 2　酵母菌落直接质粒转化法

（根据 Elble [1992] *BioTechniques* 13 [1]: 18～20 修改）

1）用牙签从平板中挑取单菌落（直径 2～3mm），转移到 1.5ml 的无菌离心管中。
2）将 10μl 载体 DNA（100μg）与 10μl 转化质粒 DNA 混合，振荡均匀。（若转化 DNA 是用未经 RNA 酶处理的“mini-prep DNA”方法制得，则不需加载体 DNA）。
3）加 0.5ml PLATE 溶液，振荡。
4）置于实验台上，室温培养 4 天。
5）置 42℃下热激 15 分钟。
6）以 8000～10000r/min 离心 10 秒沉淀细胞，小心弃去上清液，将细胞轻轻悬浮到 200μl 无菌蒸馏水中，使细胞悬浮均匀，再直接将混合液涂选择平板。

材料和溶液

PLATE 溶液

40%聚乙二醇（PEG，分子量 3350；Sigma P 3640）
0.1mol/L 醋酸锂（LiAc）
10mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）
1mmol/L EDTA

载体 DNA（10μg/μl）

提示

新培养细胞的转化效率很高，在平板上培养几个月的老细胞也可转化，但效率较低。

参 考 文 献

Elble, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* 13 (1): 18～20.

技术和方案 3　酵母 DNA 分离

A. 酵母 DNA 微量制备（40ml）

1）在 125ml 三角瓶中用 40ml YPD 培养液在 30℃条件下培养细胞达最大生长量（过夜）
2）将上述培养物移入螺盖离心管，用医用离心机或 Sorvall SS-34 转头以 5000r/min 离心 5 分钟，弃去上清液。
3）将细胞悬浮在 3ml 的 0.9mol/L 山梨醇-0.1mol/L Na_2EDTA（pH7.5）溶液中。
4）加 0.1ml 的 2.5mg/ml 消解酶® 100T，置 37℃条件保温 1 小时。
5）用医用离心机或 Sorvall SS-34 转头以 5000r/min 离心 5 分钟，弃去上清液。
6）将细胞重新悬浮在 5ml 的 50mmol/L Tris-HCl（pH7.4）-20mmol/L 醋酸钠溶液中。
7）加 0.5ml 的 10%十二烷基硫酸钠（SDS），混匀。
8）置 65℃保温 30 分钟。
9）加 1.5ml 的 5mol/L 醋酸钾溶液，在冰浴中放置 1 小时。
10）用 Sorvall SS-34 转头以 10000 r/min 离心 10 分钟。
11）将上清液转移至干净的塑料离心管中，室温下加入两倍体积的 95%乙醇，混匀，以 5000～6000r/min 离心 15 分钟。
12）弃上清液，将沉淀物干燥，然后悬浮在 3ml TE 缓冲液（pH7.4）中，此操作可能需要几个小时。
13）用 Sorvall SS-34 转头以 10000r/min 离心 15 分钟，将上清液转移到一个新试管，弃沉淀物。
14）加入 150μl 的 1mg/ml RNaseA 溶液，在 37℃下保温 30 分钟。
15）加入一倍体积的 100%异丙醇，轻轻混匀，取出呈松散纤维状的沉淀物，无需离心，让其自然干燥。
16）将沉淀物悬浮在 0.5ml TE 缓冲液（pH7.4）中，置 4℃保存。酵母 DNA 的最终浓度约为 200μg/ml。如果最后的溶液混浊不清，用异丙醇再次沉淀 DNA 或用 Sorvall SS-34 转头以 10000r/min 离心 15 分钟.

材料和溶液

装有 40ml YPD 的 125ml 三角瓶
带螺盖的离心管
0.9mol/L 山梨醇－0.1mol/L Na_2EDTA（pH7.5）（3ml）
消解酶® 100T 溶液（0.1ml）（120493-1，Seikagaku America Inc.）
　2.5mg/ml 的 0.9mol/L 山梨醇-0.1mol/L Na_2EDTA（pH7.5）
50mmol/L Tris-HCl（pH7.4）－20mmol/L Na_2EDTA（5ml）

10%十二烷基硫酸钠（SDS）
5mol/L 醋酸钾（1.5ml）
95%乙醇
TE 缓冲液（pH 7.4）：
10mmol/L Tris-HCl（pH7.4）
1mmol/L Na_2EDTA
RNaseA 溶液（150μl）：
以 1mg/ml 的浓度溶解于 50mmol/L 醋酸钾溶液（pH5.5），煮沸 10 分钟，－20℃下贮存。
无水异丙醇

B. 酵母 DNA 微量制备（5ml）

1）接酵母于 5ml YPD 中，置 30℃培养过夜。
2）用医用离心机以 2000r/min 离心 5 分钟沉淀细胞，弃上清液。
3）将细胞悬浮在 0.5ml 的 1mol/L 山梨醇－0.1mol/L Na_2EDTA（pH7.5）缓冲液中，转到一支 1.5ml 离心管中。
4）加入 0.02ml 的 2.5mg/ml 的消解酶® 100T 溶液，置 37℃保温 1 小时。
5）离心 1 分钟。
6）弃上清液，把细胞悬浮在 0.5ml 的 50mmol/L Tris-HCl（pH7.4）－ 20mmol/L Na_2EDTA 溶液。
7）加 0.05ml 的 10%SDS，混匀。
8）置 65℃保温混合物 30 分钟。
9）加 0.2ml 的 5mol/L 醋酸钾，把离心管在冰浴中放置 1 小时。
10）离心 5 分钟
11）将上清液转移到一洁净微型离心管，室温下加入等体积的无水异丙醇，混匀，放置 5 分钟。短暂离心（10 秒钟）弃上清液，让沉淀自然干燥。
12）用 0.3ml TE 缓冲液（pH7.4）重新悬浮沉淀。
13）加入 15μl 的 1 mg/ml 的 RNaseA 溶液，置 37℃保温 30 分钟（此步可任意选择）。
14）加 0.03ml 的 3mol/L 醋酸钠，混匀，用 0.2ml 的无水异丙醇沉淀，再短暂离心收集 DNA。
15）弃上清液，自然干燥，用 0.1～0.3ml TE 缓冲液（pH 7.4）重新悬浮 DNA。
16）在使用限制性内切酶酶解 DNA 之前，有必要将最终溶液离心较长时间（15 分钟）以便除去可能抑制酶解的不溶性物质。

材料和溶液

YPD
1mol/L 山梨醇－0.1mol/L Na_2EDTA（pH 7.5）（0.5ml）
消解酶® 100T（120493-1，Seikagaku，America Inc.）溶液（0.02ml）

2.5mg/ml 溶在 1mol/L 山梨醇－0.1mol/L Na_2EDTA（pH7.5）缓冲液

50mmol/L Tris-HCl（pH 7.4），20mmol/L Na_2EDTA（0.5ml）

10% SDS

5mol/L 醋酸钾（0.2ml）

无水异丙醇

TE 缓冲液（pH 7.4）：

10mmol/L Tris-HCl（pH7.4）

1mmol/L Na_2EDTA

3mol/L 醋酸钠（0.03ml）

RNaseA（15μl）（可选）：

溶解于 50mmol/L 醋酸钾（pH5.5）使浓度达 1mg/ml，煮沸 10 分钟，－20℃冷冻保存。

C. 10 分钟制备酵母 DNA 方法

（摘自 Hoffman 和 Winton，*Gene* 57：267～272［1987］）

安全须知

苯酚为强腐蚀剂，可导致严重灼伤，使用时必须带上手套、防护衣和护目镜。所有操作必须在化学通风橱中进行，所有与苯酚接触过的皮肤必须用大量水或聚乙二醇 400 冲洗，也可用香皂水冲洗，禁用乙醇冲洗。

氯仿对皮肤、眼睛、粘膜和上呼吸道有强烈刺激，必须在化学通风橱中使用，且带上手套和护目镜，氯仿有致癌作用，并对肝和肾有损伤。

硝酸易挥发，必须在通风柜中使用，浓酸须小心使用，带手套和面罩。

大肠杆菌或酵母转化质粒的制备

1）在质粒 DNA 选择性培养基（如 SC－ura）中，置 30℃培养少量培养物（至少 1.4ml）过夜。

2）将培养物转入一支 1.5ml 的微型离心管，离心 5 秒，收集细胞。

3）小心倾去上清液，轻弹离心管，使沉淀重新悬浮于残余培养液中。

4）加入 0.2ml 的 2% Triton X-100，1% SDS，100 mmol/L NaCl，10mmol/L Tris-HCl（pH8），1mmol/L Na_2EDTA；加入 0.2ml 的苯酚：氯仿：己戊醇（25：24：1）；加入 0.3g 酸洗过的玻珠。

5）振荡 2 分钟。

6）离心 5 分钟。

7）用 1～5μl 含 DNA 的水相转化 0.2ml 的大肠杆菌受体菌，用 15μl 水相转化酵母菌。

用于 Southern 分析的基因组 DNA 分离

1）用 YPD 培养基，置 30℃培养 10ml 酵母至最大生长量。

2）用医用离心机离心 2 分钟，弃上清液，收集细胞，用 0.5ml 蒸馏水重新悬浮，将细

胞转入1.5ml微型离心管中，离心5秒收集细胞。

3) 重复第2步。

4) 重复第2步。

5) 加0.2ml TE缓冲液（pH8），振荡3～4分钟。

6) 离心5分钟，将水相移至洁净试管，加1ml的无水乙醇，上下倒置，混合均匀。

7) 离心2分钟，弃上清液，悬浮在0.4ml TE缓冲液和3μl的10mg/ml的RNaseA溶液，置37℃保温5分钟，加入10μl 4mol/L醋酸铵和1ml的无水乙醇，上下倒置，混匀。

8) 离心2分钟，弃上清液，自然干燥后，用50μl的TE缓冲液悬浮，每份样品用10μl进行Southern印迹分析，每份用量约2～4μg DNA。

材料和溶液

质粒DNA用选择性培养基，如SC－ura

2% Triton X-100，1%SDS，100 mmol/L NaCl，10mmol/L Tris-HCl（pH8），1mmol/L Na_2EDTA（0.4ml）

苯酚:氯仿:己戊醇（25:24:1）(0.4ml)

玻珠

许多供应商生产的0.45～0.5mm玻珠都可以使用（如：Sigma，American QUALEX，Midnest Scientific，Stratagene），玻珠需用硝酸浸泡并用大量蒸馏水清洗，玻珠在使用前需干燥。

YPD

无菌蒸馏水

TE缓冲液（pH 8）

10mmol/L Tris-HCl（pH 8）

1mmol/L Na_2EDTA

无水乙醇

RNaseA母液（3μl）

溶于50mmol/L的醋酸钾溶液（pH 5.5），使浓度达到10mg/ml，煮沸10分钟，－20℃下冷冻保存。

4mol/L醋酸氨（10μl）

参考文献

Hoffman, C. S. and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267－272.

D. 酵母基因组DNA：玻珠制备法

1) 用5ml培养基（完全培养基或选择性培养基）在30℃下，摇床培养过夜。

2) 转移培养物至13mm×100mm的玻璃离心管中，用台式离心机以1500r/min离心5

分钟，收集细胞。

3）用 3ml 无菌水洗细胞，同上离心。

4）用 500μl 裂解缓冲液再次悬浮。

5）加入干净玻珠（约 1.5ml Eppendorf 离心管的 2/3 体积）和 25μl 的 5mol/L NaCl。

6）以最高速振荡 1 分钟。

7）以 2000r/min 离心 2 分钟。

8）用 P-1000 移液器转移上清液至一支 1.5ml 的离心管。

9）加入 500μl 苯酚，振荡，离心 1 分钟。用 P-1000 移液器吸取水相，转移至洁净离心管，加入 500μl SEVAG（氯仿:己戊醇，24 :1），同上振荡，离心，抽提。

10）加入 1ml 的 95%的冷冻乙醇，在－20℃下沉淀 1 小时。

11）以最高转速离心沉淀 DNA，弃上清液，用 70%乙醇清洗，最后悬浮在 250μl TE 缓冲液中。

技术和方案 4　酵母蛋白质的抽提

此法抽提的酵母蛋白适用于 SDS 凝胶电泳和 Western 印迹分析。

1）从 $OD_{600}=2$ 的细胞培养物中抽提酵母蛋白质。培养物的一种简单制备方法是将细胞接种到 5ml YPD 中，过夜培养后获得指数培养物（$OD_{600}=0.5\sim2.0$）。
2）在冰浴上把 $OD_{600}=2$ 的细胞培养物转到含有 2ml 的 50mmol/L Tris-HCl（pH7.5）、10mmol/L 叠氮化钠溶液的 13mm 离心管中，用吊篮式医用离心机离心沉淀细胞。
3）用 25 号针头吸出上清液，再用 30μl ESB 缓冲液悬浮细胞。
4）快速转入微型离心管，在 100℃下保温 3 分钟，使蛋白酶失活之后，样品存放于 −20℃。
5）加入 0.1g 的 0.2mm 的玻珠，或装入玻珠直至液体刚好浸没，剧烈振荡混合 2 分钟。
6）加入 70μl ESB 缓冲液，稍加振荡，置 100℃保温 1 分钟。
7）取 5～20μl 抽提液上样进行 SDS 凝胶电泳。

材料和溶液

适量的生长培养基
50mmol/L Tris-HCl（pH 7.5），10mmol/L 叠氮化钠
ESB 缓冲液（可在 4℃贮存数天）
　2% SDS
　80mmol/L Tris-HCl（pH6.8）
　10% 甘油
　1.5% 二巯基苏糖醇（DTT）
　0.1 mg/ml 溴酚蓝

提示

通常迅速煮沸样品可以防止蛋白质水解以保持其稳定。如果担心蛋白质被水解，可在 ESB 中加 PMSF 从而减少蛋白质水解，对于极不稳定的蛋白质，可采用以下抑制剂：

抑制剂	最终浓度	母液
丝氨酸蛋白酶抑制剂（苯甲基磺酰氟）	1mmol/L	100×溶于异丙醇中
胃蛋白酶抑制剂 A	0.7μl/ml	2000×溶于甲醇
亮抑蛋白酶肽	0.5μl/ml	1000×溶于水
E64	10μg/ml	1000×溶于乙醇
抑蛋白酶肽	2μg/ml	5000×溶于水
α_2 巨球蛋白	0.5U/ml	直接加入

对于疏水蛋白，如跨膜内在蛋白等样品的煮沸会导致沉集，对此类蛋白质，通过在 ESB 中加入蛋白酶抑制剂混合物，在 37℃下保温即可。

技术和方案 5　酵母 RNA 的分离

此实验的设计是为了从 500ml 培养物中得到 10mg 以上的总核酸和 300～400μg mRNA。欲获上述量，培养物以 200～500ml 为宜，明显高于或低于此体积范围则须加以调整。

接种适量过夜的新鲜培养物到 200ml YPD（或 SC），培养到第二天早上，即可得到 2×10^7～4×10^7 细胞/ml，用血球计数板（见附录 G）或克莱特（Klett）比浊仪检测细胞密度（大多数菌株可达 50～100 克莱特单位）。

安全须知

硝酸易挥发，须在通风厨中使用，使用高浓度酸应倍加小心，须戴手套和防护面罩。

苯酚为强腐蚀剂，并导致严重灼烧，使用时必须穿戴防护衣和护目镜，所有操作必须在通风橱中进行，所有与酚接触过的皮肤必须用大量水或聚乙二醇 400 冲洗，也可用香皂水冲洗，禁用乙醇。

焦碳酸二乙酯有剧毒且具挥发性，带上手套在通风橱中才可开始操作。

氯仿对皮肤、眼睛、粘膜和上呼吸道有强烈刺激，必须在通风橱中使用，应戴上手套和护目镜，氯仿有致癌作用，并可损伤肝肾。

总酵母 RNA 的分离

1）在每毫升培养物中加入 50μg 环乙酰亚胺，在 30℃下振荡 15 分钟。此步亦可省略，但是有人认为环乙酰亚胺可防止 mRNA 凝集在多核糖体上。
2）迅速冷冻收集细胞，在大离心管（Sorrall GS 或相似离心管）中加入约一半体积的碎冰，将培养物倒入，振荡，在 4℃下以 5000r/min 离心 5 分钟。
3）加入 11g 玻珠于 30ml 离心管中，以 Corex 玻璃离心管为最佳，不过塑料离心管也能使用。
4）加入 3ml 已用 LETS 缓冲液平衡的苯酚到玻珠中。
5）用 2.5ml 冰预冷的 LETS 缓冲液悬浮细胞，并将其加入到上述玻珠苯酚管中。为了使细胞破碎的最好，液面应刚好高于玻珠表面。
6）高速振荡 30 秒后，在冰上置 30 秒，交替进行 3 分钟，用相差显微镜检测细胞破碎情况，破碎的细胞呈现无折射的空细胞。
7）当至少 90％细胞破碎后，加 5ml 冰预冷的 LETS 缓冲液，轻微振荡，用 Sorvall SS-34 转头以 8000r/min 离心 5 分钟，使溶液分相。离心后，酚层和蛋白质界面应刚好低于玻珠表面，移出水相而不会触动界面。
8）将水相转到一个干净离心管，用 5ml 苯酚:氯仿:己戊醇（25:24:1）抽提 2 次，避免触动界面。用氯仿抽提一次。

9）加入 1/10 体积的 5mol/L 氯化锂，在 -20℃下沉淀 3 小时。此时，RNA 沉淀可在 -20℃下存放。

poly（A）$^+$RNA 的分离

1）将保存的 RNA 用 Sorvall SS-34 转头以 10 000r/min 离心 10 分钟，收集 RNA 沉淀，用 80%乙醇洗涤。真空干燥后，溶于 2.5ml 蒸馏水中，溶解后加入 2.5ml 2×上样缓冲液，同时加 SDS 至终浓度为 0.3%。
2）置 65℃保温 5 分钟。
3）装一个 oligo（dT）柱，用 1×上样缓冲液洗 3 次。
4）用 10mmol/L HEPES（pH7）洗脱 Poly（A）$^+$RNA。如果希望得到更满意的结果，可以加入 RNase 抑制剂。
5）用蒸馏水对 Poly（A）$^+$RNA 进行 10 倍稀释，通过 OD_{260}的光吸收测定 RNA 浓度。用水将 10mmol/L HEPES（pH7）稀释 10 倍（即 1mmol/L HEPES）作为对照。
6）加 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 RNA，上下倒置混匀，在 -70℃下放置 30 分钟。离心 10 分钟，弃上清液，用水溶解 RNA 沉淀使终浓度为 1mg/ml。不管是溶解的 RNA 或是乙醇沉淀的 RNA 都能在 -70℃下长期保存。

材料

环乙酰亚氨（50μg/ml 培养物）（可任选）
大离心管（Sorvall GS3 或类似型号）
玻珠

不同商家的 0.45～0.5mm 玻珠都可使用（如 Sigma，American QUALEX，Midwest Scientific，Stratagene）用硝酸浸泡玻珠，再用大量的蒸馏水清洗使其净化。使用前需进行干燥。

离心管（Corex 玻璃或塑料，30ml）
用 LETS 缓冲液平衡的苯酚（3ml）
LETS 缓冲液

0.1mol/L 氯化锂（LiCl）
0.01mol/L Na_2EDTA
0.01mol/L Tris-HCl（pH7.4）
0.2% SDS
0.1% 二乙基焦碳酸（可任选）

苯酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）
氯仿（可任选）
5mol/L 氯化锂
80%乙醇
无菌蒸馏水
1×上样缓冲液

0.5mol/L NaCl

0.01mol/L HEPES（pH 7）

SDS

oligo（dT）柱

10mmol/L HEPES（pH7）

RNase 抑制剂（可任选）

3mol/L 醋酸钠

无水乙醇

技术和方案 6　质粒 DNA 的羟胺突变

安全须知

羟胺是一种诱变剂，应小心操作，操作时戴手套。
固体氢氧化钠具有腐蚀性，应谨慎操作，戴手套和护面罩。

1）临用之前制备羟胺溶液，置冰上待用。
2）将用氯化铯纯化的 10μg 质粒 DNA 加到含 500μl 羟胺溶液的微型离心管中。
3）在 37℃下培养 20 小时。
4）加入 10μl 的 5mol/L NaCl、50μl 1mg/ml 的牛血清蛋白（BSA）和 1ml 无水乙醇终止反应，置 -70℃沉淀 DNA 10 分钟。
5）离心 10 分钟，小心弃所有上清液，收集 DNA。
6）将 DNA 悬浮于 100μl TE 缓冲液（pH 8）中，再加入 10μl 3mol/L 的醋酸钠和 250μl 的无水乙醇，在 -70℃下放置 10 分钟，重复步骤 5，收集 DNA。
7）让沉淀自然干燥，再悬浮于 100μl TE 缓冲液（pH 8）。
8）该 DNA 可直接用于大肠杆菌或酵母的转化。诱变 DNA 与非诱变 DNA 相比，酵母的转化频率相对降低约 3 倍。在大肠杆菌中，Ura^- 质粒可被检出。
如果大肠杆菌菌株是 *ung*$^+$，其转化率将降低 10～100 倍，当 *URA3* 基因约占整个质粒 DNA 的 10%时，转化 *ung*$^+$ *pyrF*$^-$ 大肠杆菌菌株（DB6507），有望获得约 4% Ura^- 转化菌落，用同样的诱变 DNA 母液转化酵母，失去功能的突变约 1%（剔除实验）。大约有 10%的突变体是温度敏感型。

材料和溶液

羟胺溶液
称 0.35g 羟胺盐酸，0.09g 氢氧化钠，加 5ml 冰冷蒸馏水，用水溶解固体，将 pH 值调至 7，临用前制备，放冰浴中备用。
氯化铯纯化质粒 DNA（10μg）
5mol/L 氯化钠
1mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）
无水乙醇（100%）
TE 缓冲液（pH 8）
10mmol/L Tris-HCl（pH 8）
1mmol/L Na_2EDTA
3mol/L 醋酸钠

技术和方案 7 酵母 β· 半乳糖苷酶的测定

有两种体外检测酵母 β-半乳糖苷酶的基本方法，主要区别是所用测定材料的制备方法不同。第一种方法是利用制备粗抽提物并通过蛋白质定量分析进行酶活测定（Rose 和 Botstein 1983）。第二种方法是利用细胞的通透性使底物进入细胞并通过测定细胞数量进行酶活测定（Guarente 1983）。在比较不同条件下生长或有不同遗传背景的细胞时，第一种方法较好。第二种方法是根据大肠杆菌的检测方法改进的，特别适合于测定单个细胞内活性水平的改变。

方法 1：粗提取物测定

安全须知

硝酸易挥发，应在通风橱中使用。对浓硝酸应戴手套及防护面罩，谨慎操作。

PMSF 对上呼吸道粘膜、眼睛和皮肤有极大的损伤作用。若吸入、吞咽或通过皮肤吸收，会有生命危险。万一沾污了 PMSF，应立即用大量的水冲洗，丢掉被玷污的衣服。

氯仿对皮肤、眼睛、粘膜以及呼吸道有刺激作用，只能在通风橱中使用，戴上手套和护目镜。氯仿是致癌物，对肝和肾有损伤作用。

1）在适当温度下（通常 30℃），用适当培养液将 5ml 细胞培养物培养到浓度为 1×10^7 ～2×10^7 细胞/ml。如果自主复制质粒的杂合基因表达，可使用一种适当培养基对存在质粒的菌株进行筛选。

2）在冰上冷却细胞，离心收集（用医用离心机以 2000r/min 离心 5 分钟）。

注意：从这一步骤开始，保持细胞在冰上。

3）弃上清液，将细胞悬浮于 250 μl 裂解缓冲液中，然后置 -20℃ 冻结，以备第二天测定。

以下步骤均在 1.5ml 离心管中进行。

4）若细胞冻结，可在冰上将其解冻。加玻珠恰好到液面下，再加 12.5μl PMSF 母液。

5）以高速振荡混合 6 次，每次 15 秒，间歇时放在冰上。

6）加入 250μl 的裂解缓冲液，用 1000μl 移液器插到离心管底部抽打使其充分混匀。

7）离心 15 分钟澄清提取物。如果活性成分存在于颗粒状碎片中，则可用未澄清的上清液，而测定的混合物将在步骤 8 澄清。

8）测定：

a. 加 10～100μl 抽提物到 0.9ml 的 Z 缓冲液中，用裂解缓冲液（breaking buffer）定容至 1ml。

b. 在 28℃ 水浴中将混合物保温 5 分钟。

c. 加入 0.2ml 邻硝基苯-β-D 半乳吡喃糖苷（ONPG）母液，开始反应，注意记录

准确时间，在28℃下保温至混合物产生淡黄色。

d. 加入0.5ml碳酸钠母液终止反应，注意准确记录反应终止的时间，在420nm波长下测定光密度。

9）采用Bradford（1976）染料结合测定法测定抽提物中的蛋白质浓度。

a. 用蒸馏水将Bradford试剂稀释5倍。用Whatman540号（或类似型号）滤纸过滤稀释试剂。

b. 加10～20μl抽提物到1ml稀释试剂中，并混合。在595nm波长下测定形成的蓝色溶液。用一次性塑料比色杯以防止形成蓝膜影响测定结果。

c. 将BSA溶解于裂解缓冲液中，选用几个不同稀释度（0.1～1mg/ml）制成标准曲线。

用这种方法制备的抽提物含有0.5～1.0mg/ml蛋白质。

10）根据下面公式计算抽提物的特异活性：

$$\frac{OD_{420}\times 1.7}{0.0045\times 蛋白质\times 抽提物体积\times 时间}$$

OD_{420}是产物邻硝基苯酚在波长420nm下的光密度；系数1.7是反应体积的修正值；系数0.0045是1 nmol/ml邻硝基苯酚溶液的光密度；蛋白质浓度用mg/ml表示。抽提物体积用ml表示；时间用分钟表示；特异酶活用nmol/min/mg蛋白质表示。

方法2：通透细胞测定法

1）按上述方法培养细胞，测定培养物的OD_{600}，当培养物细胞密度达1×10^6～1×10^7细胞/ml，同方法1离心收集细胞。

2）弃上清液，将细胞悬浮于1ml Z缓冲液中。

3）加入3滴氯仿和2滴0.1% SDS，高速振荡10秒钟。

4）在28℃下预保温样品5分钟，同方法1加入0.2ml ONPG开始反应。

5）当试管中的样品变为淡黄色时，加入0.5ml碳酸钠母液终止反应。注意在测定时所花时间，离心10分钟，弃细胞碎片和沉淀物。

6）测定反应物OD_{420}的光密度。

7）β-半乳糖苷酶的活性单位为：

$$\frac{OD_{420}}{培养物\ OD_{600}的光密度\times 测定体积\times 时间}$$

OD_{420}是产物邻硝基苯酚的光密度；OD_{600}是培养物的光密度；体积是指测定时所用培养物量，用ml表示；时间用分钟表示。

材料和溶液

合适的液体培养基

裂解缓冲液

100mmol/L Tris-HCl（pH 8）

1mmol/L 二硫苏糖醇

20% 甘油

玻珠

来自不同供应商（如：Sigma，American QUALEX，Midwest Seientific，Stratagene）直径 0.45～0.5mm 的玻珠都是可用的。用硝酸浸泡玻珠使其洁净，然后用大量蒸馏水清洗，玻珠干燥后方可使用。

PMSF（sigma P 7626）母液

用无水异丙醇（100%）制备成 40mmol/L 溶液，保存在 -20℃ 条件下。

Z 缓冲液（Miller 1972）

16.1g	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
5.5g	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
0.75g	KCl
0.246g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
2.7ml	β-巯基乙醇

用蒸馏水定容至 1 升

调 pH 至 7.0，保存于 4℃

ONPG 母液

用 Z 缓冲液制备成 4mg/ml 溶液，保存于 -20℃

Na_2CO_3 母液

用蒸馏水制备 1mol/L Na_2CO_3 溶液

Bradford 试剂（Bio-Rad）

蒸馏水

Whatman 540 型滤纸或类似型号

一次性塑料比色杯

用裂解缓冲液制备 0.1～1mg/ml 牛血清白蛋白溶液

氯仿

0.1% SDS

参 考 文 献

Bradford, M. M. 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72: 248～254.

Guarente, L. 1983. Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101: 181～191.

Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Rose, M. and D. Botstein. 1983. Construction and use of gene fusions *lacz* (β-galactosidase) which are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* 101: 167～180.

技术和方案 8　羧肽酶 Y 的平板鉴定

（根据 *Methods in Enzymology* [Jones 1991] 194：428～453 [436～439] 改编）

1）在 YPD 平板上培养菌落或菌苔（通常菌落长 3 天，菌苔长 1 天即可）。
2）小心把涂盖液加在平板的表面使之完全覆盖细胞。
3）待琼脂凝固 5～10 分钟后，小心用新鲜 Fast Garnet GBC 溶液冲刷表面。
4）显色 5 分钟，野生型菌株将变红，而羧肽酶 Y^- 菌株将呈现黄色或粉红色。
5）倒出 Fast Garnet 溶液以便更好观察颜色变化。

材料和溶液

涂盖液（用于一个平板的量）

用玻璃或聚丙烯试管，取 2.5ml 的 1mg/ml *N*-乙酰-DL-苯丙氨酸-β-萘酯（溶在二甲基甲酰氨中）与 4ml 的 0.6%熔化琼脂混合，保温在 50℃

Fast Garnet GBC 溶液（每个平板用 5ml）

5mg/ml Fast Garnet GBC［硫酸盐，Sigma F 8761，溶在 0.1mol/L Tris-HCl (pH7.4)］。

二甲基甲酰氨渗透到细胞中，细胞中的羧肽酶切割 *N*-乙酰-DL-苯丙氨酸-β-萘酯的酯键，游离的β-萘酚与重氨盐 Fast Garnet GBC 反应产生一种不溶性的红色沉淀。

参 考 文 献

Jones, E. W. 1991. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*. 194：428～453.

技术和方案 9　随机孢子分析

Ⅰ. 孢子形成

1）挑已形成孢子的二倍体单菌落接种在 YPD 平板上，尽可能把细胞涂薄一些，在 30℃下培养 12～16 小时，超过 16 小时将明显降低孢子的形成率。
2）上午，用一个无菌壳板钉取相当一火柴头量的细胞，转到含有 2.5ml 产孢培养基的试管中，在 25℃下旋转振荡培养。
3）用光学显微镜检测孢子形成情况。要使 5%以上的细胞形成孢子需花 2～10 天。

Ⅱ. 随机孢子

4）取 1ml 形成孢子的培养物转到 15ml 的锥形聚苯乙烯离心管，用医用离心机离心 5 分钟沉淀细胞。
5）彻底除去上清液，把细胞悬浮在 0.2ml 无菌水和 5μl β-葡糖苷酸酶（约 500 个单位）。
6）在 30℃条件下旋转振荡培养 1 小时。
7）加 0.1ml（约 0.15 克）灭菌的 0.5 mm 玻珠，在 30℃条件下旋转振荡培养 1 小时。
8）加 1ml 无菌水。
9）振荡 1～2 分钟，用光学显微镜检查子囊是否完全破裂。
10）加 4ml 无菌水。
11）用无菌水做 10^{-1}～10^{-3}稀释度，在含有 60μg/ml 刀豆氨酸的 SC－arg 平板上涂 200μl。

材料和溶液

产孢培养基
　1%KOAc
　0.025% 葡萄糖
β-葡糖醛酸糖苷酶（Sigma G 7770）
无菌 0.5mm 玻珠
含有 60μg/ml 刀豆氨酸的 SC－arg 平板

技术和方案 10　酵母活体染色

核 DNA 和线粒体 DNA

安全须知

DAPI 是一种可能的致癌物。如果吸入、吞下或通过皮肤吸收是有害的，也可能引起炎症。必须戴手套、面具和安全镜，不要吸入尘粉。

1）当细胞培养到约 10^7 细胞/ml 时，离心（5 秒）收集细胞，再悬浮在 70% 乙醇中。
2）固定 5 分钟或 5 分钟以上，用水洗 2 次。
3）将细胞悬浮在含有 50ng/ml 的 4，6 -二脒基- 2 -苯基吲哚（DAPI，Sigma D 9542 或 Accurate Chemical and Scientific Corp.）的封固剂中。1mg/ml 的 4，6 -二脒基- 2 -苯基吲哚母液可在 -20℃下贮存。
4）用紫外滤片观察。

用甲醛固定的细胞也能在封固剂中用 4，6 -二脒基- 2 -苯基吲哚染色。4，6 -二脒基- 2 -苯基吲哚也能以 1μg/ml 的浓度对生长培养中的活细胞染色，但是，活细胞的染色背景没有固定化细胞那么清晰。

线粒体

1）在生长培养基中培养细胞达到约 10^7 细胞/ml 时，加入 100 ng/ml 3，3′-二己基噁羰花青碘化物（$DiOC_6$，Sigma D_{3652}或 Molecular Probes）用乙醇把 1mg/ml 母液稀释到 $1/10^4$（母液在 -20℃黑暗中保存几个月是稳定的）。
2）培养 5 分钟或 5 分钟以上，用荧光素滤片观察。

$DiOC_6$ 的浓度需要优化选择，约 1μg/ml 即可使所有膜染色。

液泡

1）当细胞生长到约 10^7 细胞/ml 时，离心收集细胞（5 秒），悬浮在含有 50mmol/L 柠檬酸钠（pH4.0）的 YPD 中。
2）加 CDCFDA（羧基- 2′，7′-二氯-荧光素双乙酸盐）到终浓度为 10μmol/L（将 10mmol/L 母液稀释到 1/1000，该母液溶在二甲基甲酰氨中，在 -20℃下可保存数月。
3）保温 10 分钟或 10 分钟以上，用荧光滤片观察。

芽痕和几丁质

1）用生长培养基培养细胞达 10^7 细胞/ml 时，加 100μg/ml Calcofluor(荧光发光剂 28；Sigma F3543)(用水将 1mg/ml 母液稀释到 1/10，母液可在 -20℃下黑暗保存数星期)。
2）培养 5 分钟或 5 分钟以上，用水洗 2 次，用紫外滤片观察。

技术和方案 11　酵母免疫荧光

细胞制备

安全须知

甲醛是有毒的，是一种致癌物。它容易通过皮肤吸收，对眼睛、皮肤、粘膜和上呼吸道有刺激作用。必须戴手套、安全镜在通风橱中操作。

1）培养 5ml 酵母至对数生长早期（10^6～10^7 细胞/ml）。
2）直接加 1/10 体积的甲醛到培养基里固定细胞（加入的甲醛终浓度为 3.7%，标准母液是 37%）。
3）细胞在甲醛中培养至少 1 小时。
4）离心收集细胞，用 0.1mol/L 磷酸钾（pH 7.5）洗一次。
5）把细胞悬浮在 1ml 的 50mg/ml 消解酶® 100T 或 50 单位/ml 的溶细胞酶［溶于含有 2ml/ml 6-巯基乙醇的 0.1 mol/L 的磷酸钾溶液中。
6）置 30℃培养 30 分钟，用相差显微镜检查原生质体的生成率。细胞应呈黑色或半透明灰色，亮细胞（折射体）属于没有充分被消化的。菌蜕（内部结构呈淡灰色）属消化过度。
7）离心收集细胞，悬浮在 1ml 的 PBS 中。

染色

安全须知

4，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）是一种可能的致癌物，如果吸入、吞咽或通过皮肤吸收是有害的，也可能引起炎症。戴手套、面具和安全镜且不要吸入尘粉。

1）取 10ml 的 1mg/ml 聚赖氨酸（分子量为 400 000），放到用特氟隆封闭的（Teflon-masked slides）载玻片（10 孔载玻片）上的每个孔，再用蒸馏水洗载玻片，干燥。
2）放 10ml 固定化细胞到每个孔中，几分钟后，用 PBS 抽洗 3 次。用显微镜检测载玻片确保细胞呈合适的密度而不聚集。
3）该步骤可任选（本实验不需要使用抗体，但建议使用）：
把载玻片浸泡在冷甲醇（－20℃）6 分钟，然后放到冷丙酮（－20℃）30 秒，该处理产生扁平细胞，有助于细胞骨架的观察。对于一些抗体-抗原结合物，需要这些步骤重新活化，用 PBS 重新润湿玻孔。
4）加 15ml 由 PBS＋3%BSA（牛血清白蛋白）组成的阻断缓冲液到玻孔中。在保湿盒子中，如垫有湿纸巾的平板中保温 30 分钟。重要的是，在这期间不能让载玻片孔干透（BSA 可通过阻断蛋白质结合位点降低非特异抗体结合到载玻片）。
5）吸出阻断缓冲液，用 PBS＋3%BSA 洗两次。

6）加 10～15ml 第一抗体（溶解在 PBS+3%BSA）到载玻片孔中，在一个保湿盒中保温 1 小时。用亲和纯化抗体或单克隆抗体，如果可能，用缺乏目的抗原的同源对照。作一个没有第一抗体的对照也是有帮助的。

7）吸出第一抗体，用 PBS+3%BSA 洗 3 次。

8）用荧光第二抗体重复第 6～7 步（在暗处培养）。

9）吸出第二抗体，用 PBS+3%BSA 洗 3 次。

10）加 10～15ml 的 1μg/ml DAPI 到载玻片孔中，培养约 1 分钟，用 PBS 洗 3 次。

11）吸出 PBS，给每个孔加一小滴封固剂，放盖玻片，避免在孔中出现气泡。用纸巾除去多余的封固剂，小心不要移动盖玻片，用干净的指甲油密封，－20℃下保存。

材料和溶液

消解酶® 100T（120493-1，Seikagaku America Inc.）

封固剂

将 50mg 对-苯二胺溶解在 50ml PBS（见下文），调到 pH 9，加 45ml 甘油，搅拌均匀。分装，在－70℃下黑暗保存（根据 Johnson 和 Nogueira Araujo 1981 加以修正）。

如需要染色 DNA，封固剂应含有包括 4，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI，Sigma D 9542 或 Accurate Chemical and Scientific Corp.）（Williamson 和 Fennell 1975），在 50ml 封固剂中加 2.5ml 新鲜 4，6-二脒基-2-苯基吲哚溶液（1mg DAPI/ml H_2O）。

PBS

每升20×母液含

160g NaCl

4g KCl

22.8g Na_2HPO_4

4g KH_2PO_4

用 10mol/L NaOH 调至 pH7.3。

参 考 文 献

Johnson, G. D. and G. M. Nogueira Araujo. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Methods* 43: 349～350.

Williamson, D. H. and D. J. Fennell. 1975. The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol.* 12: 335～351.

技术和方案 12　固定化细胞的肌动蛋白染色

鬼笔环肽特异地与 F-肌动蛋白结合，故而可以用荧光标记的鬼笔环肽对细胞内的肌动蛋白染色，这种方法非常近似于使用抗肌动蛋白抗体的染色模式。

安全须知

甲醛是有毒的，是一种致癌物。它能通过皮肤吸收，对眼睛、粘膜和上呼吸道有刺激作用。必须戴手套、安全镜，并保持在通风橱中操作。

1）培养细胞到对数生长期（约 10^7 细胞/ml）。
2）直接取 0.1ml 甲醛加到含有 1ml 培养物的离心管中固定细胞（甲醛浓度为 3.7%；标准母液是 37%）。
3）在甲醛中培养细胞 30 分钟或稍长时间。
4）用 PBS 洗两次，离心 5 秒钟收集细胞。
5）用 50μl 的 PBS 悬浮细胞，加 5 个单位的罗丹明（rhodamine）或荧光素连接的鬼笔环肽（正常情况下，取 25μl 的 200U/ml 的母液，母液在甲醇中置 -20℃ 可保存数月）。
6）用 PBS 洗 3 次，重新悬浮在小体积的封固剂中。
7）用罗丹明或荧光素滤片观察。

技术和方案 13　PCR 介导基因破坏法

（根据 Brachmann et al.［1997］Yeast 改编）

1）反应混合物：

5μl	10× *Taq* 缓冲液
5μl	25mmol/L $MgCl_2$
2μl	10mmol/L dNTPs
10～100ng	模板 DNA
25pmols	引物（每种引物）
0.5μl	*Taq* DNA 聚合酶（2U）
加水至总体积 50μl	

2）PCR 循环参数：

94℃　5 分钟

94℃　1 分钟
55℃　1 分钟
72℃　2 分钟
10 个循环

94℃　1 分钟
65℃　1 分钟
72℃　2 分钟
20 个循环

72℃　10 分钟

注意：虽然纯化扩增产物可显著增加转化效率，但实际上反应物能直接用于转化。我们成功的使用了 Wizard™ PCR Preps DNA 纯化系统（Promega Corp. A 7170）。

材料和溶液

10× *Taq* 缓冲液
　0.5mol/L KCl
　100mmol/L Tris-HCl（pH 8.5）
　0.1% Triton X-100
25mmol/L $MgCl_2$
10mmol/L dNTPs
pRS40 X 模板 DNA（用 mini-prep DNA 较好）

Taq DNA 聚合酶

两个基因特异 DNA 引物

靶区域末端同源的 40 个寡核苷酸引物序列为：

5′-CTGTGCGGTATTTCACACCG-3′（左侧引物）

另一侧靶区域同源的 40 个寡核苷酸引物序列为：

5′-AGATTGTACTGAGAGTGCAC-3′（右侧引物）

这两个引物可用于扩增任何来自 pRS40X 或 pRS30X 整合质粒的任何营养缺陷型标记（Sikorski 和 Hieter 1989，Brachmann et al. 1997）。

参 考 文 献

Brachmann, C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J. D. Boeke, 1997. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR mediated gene disruption and other applications. *Yeast* (in press).

Sikorski, R. S. and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19～27.

技术和方案 14　酵母菌落 PCR 方法

1）在冰上配制反应混合液：

2μl	10×菌落 PCR 缓冲液
1.2μl	25mmol/L $MgCl_2$
0.4μl	10mmol/L dNTPs
10pmol	引物（每一种引物）
0.2μl	*Taq* DNA 聚合酶（5U）
加水到总体积为 20μl	

2）用移液器加微量细胞（约 0.25μl）到 PCR 反应混合液中（20μl 反应体积）

3）PCR 循环参数：

94℃	4 分钟
94℃	1 分钟
55℃	1 分钟
72℃	2 分钟
35 个循环	
72℃	10 分钟

4）上全部样品进行琼脂糖电泳。

材料和溶液

10×菌落 PCR 缓冲液

0.56mol/L KCl

0.125mol/L Tris-HCl（pH8.5）

25mmol/L $MgCl_2$

10mmol/L dNTPs

Taq DNA 聚合酶

两种基因特异 DNA 引物

每种寡核苷酸为 25 个碱基，可特异结合在被扩增靶区域的两侧。

注意：当基因≤1.5kb 时，上述链延伸时间（在 72℃下）非常适宜。对扩增较长的片段，这些条件可能需要改变。

附 录

附录 A　培养基

用 2L 的三角瓶装 1 升培养基可制备 30～40 套平板。除非另有说明，所有培养基成分都放在一起 121℃、15 lb/sq. in. 灭菌 15 分钟。较长时间的高压灭菌会导致琼脂的水解、葡萄糖焦化和软化平板。如果制备大量培养基，将盐类、葡萄糖和琼脂分开单独灭菌较长的时间，倒好平板后，让平板在室温下干 2～3 天，把平板放入密封塑料袋中可保存 3 个月以上。液体培养基不加琼脂（为方便起见，培养基中每种成分的终浓度列在下面括号内）。

YPD（YEPD）

YPD 是一种常用复合培养基。

细菌培养用酵母抽提物（1%）	10g
细菌培养用蛋白胨（2%）	20g
葡萄糖（2%）	20g
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	1000ml

YPG（YEPG 或 YEP-甘油）

YPG 是一种含有不能让 ρ-或 *pet* 突变株生长的非发酵碳源（甘油）复合培养基。

细菌培养用酵母抽提物（1%）	10g
细菌培养用蛋白胨（2%）	20g
甘油（3% [v/v]）	30ml
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	970ml

YPDG

YPDG 是一种能用于区别 ρ^+ 和 ρ^- 菌落的复合培养基。

细菌培养用琼脂（2%）	20g
细菌培养用酵母抽提物（1%）	10g
细菌培养用蛋白胨（2%）	20g
蒸馏水	900ml
上述成分一起灭菌后，加入下列无菌溶液：	
30%甘油（3%）	100ml
20% 葡萄糖（0.1%）	5ml

YPAD（斜面培养基）

YPAD是一种用于制备斜面的复合培养基，加腺嘌呤抑制 *ade1* 和 *ade2* 突变株的回复突变。

细菌培养用酵母粉（1%）	10g
细菌培养用蛋白胨（2%）	20g
葡萄糖（2%）	20g
硫酸腺嘌呤（0.004%）	40mg
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	1000ml

在沸水浴中溶解培养基，用自动取样器分别取 1.5ml 加到 1 打兰（1 打兰＝3.887 克）小瓶中，旋松瓶盖，灭菌后，倾斜瓶架以便恰好使琼脂在瓶茎之下形成斜面，1～2 天后，旋紧瓶盖。

合成右旋糖基本培养基（SD）

SD是一种含有盐、微量元素、维生素、氮源（去氨基酸的细菌培养用酵母氮碱）和葡萄糖的基本培养基。

去氨基酸的细菌培养用酵母氮碱（0.67%）	6.7g
葡萄糖（2%）	20g
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	1000ml

补充基本培养基（SMM）

SMM是在SD中加入不同生长补充物的培养基，SMM的具体组成在每个实验的材料部分有明确的规定。为方便起见，通过121℃灭菌15分钟制备无菌母液，这些母液能贮存较长时间。其中一些需室温保存以免出现沉淀，而另一些需要冷藏。如有可能，选择使用氨基酸盐酸盐制备培养基是较好的。

通过将适当体积的母液加到SD培养基成分中，然后用蒸馏水调整体积到1升，制备成补充基本培养基。苏氨酸和天冬氨酸在培养基灭菌后，单独加到培养基中。

更方便的方法是将少量的补充液涂到SD平板的表面制备培养基，在接种酵母之前，让平板上的溶液完全干燥。

以下列出的是母液的浓度，需要混合1升培养基的母液体积和涂SD平板的母液体积以及在SMM中的每种成分终浓度。

合成完全培养基（SC）和省却（drop-out）培养基

为了测试菌株生长的必需营养成分，需用一类培养基，在这类培养基中，除了待测的一种目标营养缺陷型外（drop-out培养基），补充通常所遇到的每种辅源营养。干燥的生长补充物预混合后保存。

成分	母液浓度（g/100ml）	1升培养基中需母液的体积（ml）	在培养基中的终浓度（mg/L）	涂平板的母液体积（ml）
硫酸腺嘌呤	0.2[a]	10	20	0.2
尿嘧啶	0.2[a]	10	20	0.2
L-色氨酸	1	2	20	0.1
L-组氨酸盐酸盐	1	2	20	0.1
L-精氨酸盐酸盐	1	2	20	0.1
L-甲硫氨酸	1	2	20	0.1
L-酪氨酸	0.2	15	30	0.2
L-亮氨酸	1	10	100	0.1
L-异亮氨酸	1	3	30	0.1
L-赖氨酸盐酸盐	1	3	30	0.1
L-苯丙氨酸	1[a]	5	50	0.1
L-谷氨酸	1[a]	10	100	0.2
L-天冬氨酸	1[a,b]	10	100	0.2
L-缬氨酸	3	5	150	0.1
L-苏氨酸	4[a,b]	5	200	0.1
L-丝氨酸	8	5	400	0.1

a 室温保存

b 培养基高压灭菌后加入

SC是一种完全培养基，这种培养基中含有省却培养基所有的可能补充物（即没有加入的那种成分便是“省却”的）。

去氨基酸的细菌培养用酵母氮碱（0.67%）	6.7g
葡萄糖（2%）	20g
细菌培养用琼脂（2%）	20g
省却混合物（0.2%）	2g
蒸馏水	1000ml

省却混合物

省却混合物是下列成分减去适当补充物的组合。通过加入两块干净的大理石，上下倒置至少15分钟使其彻底混匀。

腺嘌呤	0.5g	亮氨酸	10.0g
丙氨酸	2.0g	赖氨酸	2.0g
精氨酸	2.0g	甲硫氨酸	2.0g
天冬酰胺	2.0g	对氨基苯甲酸	0.2g
天冬氨酸	2.0g	苯丙氨酸	2.0g
半胱氨酸	2.0g	脯氨酸	2.0g
谷酰氨	2.0g	丝氨酸	2.0g

谷氨酸	2.0g	苏氨酸	2.0g
甘氨酸	2.0g	色氨酸	2.0g
组氨酸	2.0g	酪氨酸	2.0g
肌醇	2.0g	尿嘧啶	2.0g
异亮氨酸	2.0g	缬氨酸	2.0g

HARTWELL'S 完全培养基（HC）

在 Lee Hactwell 实验室，使用的 HC 培养基在方法上与 SC 培养基（见上述）是相同的。然而，它所使用生长补充物的组合不同。这个不同可让一些菌株长得更好。另外，在批量制备培养基时用以下介绍的一系列母液选择容易制备的 6 种最常用省却培养基可获得非常好的重复性结果。

这些母液的成分是：

10×HC（省却 6 种氨基酸液）：

甲硫氨酸	0.8g
色氨酸	2.4g
异亮氨酸	3.2g
苯丙氨酸	2.0g
谷氨酸	4.0g
苏氨酸	8.0g
天冬氨酸	4.0g
缬氨酸	6.0g
丝氨酸	16.0g
精氨酸	0.8g

终体积为 4L，高压灭菌。

10×YNB：

酵母氮碱（去氨基酸和去硫酸铵）	58g
硫酸铵	200g

终体积为 4L，高压灭菌。

氨基酸溶液（注：不是 10×溶液，见下面）：

高压灭菌每一种溶液，色氨酸应保存于棕色瓶内。

尿嘧啶	1g/L
腺嘌呤	1g/L
赖氨酸	10g/L
色氨酸	10g/L
亮氨酸	20g/L
组氨酸	10g/L

Hartwell 完全平板培养基

将 20 克琼脂溶于 619ml 蒸馏水，置 2L 三角瓶中灭菌 20 分钟，再加入以下成分：

20% 葡萄糖（无菌）	100ml
10× YNB	100ml
10× HC 省却 6 种氨基酸液	100ml
尿嘧啶溶液	35ml
腺嘌呤溶液	20ml
赖氨酸溶液	12ml
色氨酸溶液	8ml
亮氨酸溶液	4ml
组氨酸溶液	2ml

MAL 指示培养基

MAL 指示培养基是一种用于鉴别菌株是否能发酵麦芽糖的指示培养基。由于 pH 值的改变，发酵麦芽糖的菌株将改变指示剂使其呈黄色。

细菌培养用酵母抽提物（1%）	10g
细菌培养用蛋白胨（2%）	20g
麦芽糖（2%）	20g
溴甲酚紫溶液（0.4% 母液）	9ml
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	1000ml

0.4% 的溴甲酚紫溶液：

溴甲酸酚紫	200mg
无水乙醇（100%）	50ml

GAL 指示培养基

GAL 指示培养基用于评估发酵半乳糖的能力。

细菌培养用酵母粉（1%）	10g
蛋白胨（2%）	20g
细菌培养用琼脂（2%）	20g
溴甲酚蓝溶液（4mg/ml 母液）	20ml
蒸馏水	880ml

高压灭菌后，加 100ml 过滤（0.2μm 孔径的滤膜）除菌的 20% 半乳糖溶液。

溴甲酚蓝溶液：

溴甲酚蓝	400mg
蒸馏水	100ml

酵母 X－GAL 指示平板

5－溴－4－氯－3－吲哚－β－半乳糖苷（X－gal）通常在酸性 pH 的 SD 培养基上对酵母不起作用，因此使用中性 pH 值的培养基。很明显，许多酵母在这种替换的 pH 条件下不能很好地生长，为了评估 β－半乳糖苷酶的表达，该培养基是一个有价值的尝试。

溶液Ⅰ：

混合液：

10×磷酸缓冲母液	100ml
1000×无机盐母液	1ml
省却混合物	2g

如果培养基含有葡萄糖，用蒸馏水调到 450ml；如果培养基含有半乳糖，用蒸馏水调到 400ml。

溶液Ⅱ：

在一个 2 升三角瓶内混合：

细菌培养用琼脂	20g
蒸馏水	500ml

分别对以上溶液灭菌。当冷却至 65℃以下时，向溶液Ⅰ中加入下列成分：

葡萄糖或其他糖至终浓度为 2%	
X－gal（20mg/ml，溶解于二甲基甲酰胺中）	2ml
100×维生素母液	10ml
其他对热敏感的补充成分	

混合上述溶液，每平板约铺 30ml。

10×磷酸缓冲液母液：

KH_2PO_4（1mol/L）	136.1g
$(NH_4)_2SO_4$（0.15mol/L）	19.8g
KOH（0.75mol/L）	42.1g
蒸馏水	1000ml

调至 pH7，高压灭菌。

安全须知：固体 KOH 具腐蚀性，操作时要格外小心，必须戴手套和面罩。

1000×无机盐母液：

$FeCl_3$（2mmol/L）	32mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$（0.8mol/L）	19.72g
蒸馏水	100ml

灭菌保存。这种溶液会形成黄色微粒沉淀，使用前必须重新悬浮。

100×维生素母液：

硫胺素（0.04mg/ml）	4mg
生物素（2μg/ml）	0.2mg
吡哆醇（0.04mg/ml）	4mg
肌醇（0.2mg/ml）	20mg
泛酸（0.04mg/ml）	4mg
蒸馏水	100ml

用0.2μm微孔滤膜过滤除菌。

滤膜裂解酵母细胞X-Gal平板培养基

这些平板用来检查已被裂解并固定在3MM滤膜上细胞中的β-半乳糖苷酶活性。

细菌培养用琼脂	20g
1mol/LNa_2HPO_4	57.7ml
1mol/LNaH_2PO_4	42.3ml
$MgSO_4$	0.25g
蒸馏水	900ml

灭菌后，加6ml的X-Gal溶液（20mg/ml溶于*N*，*N*-二甲基甲酰胺）

产孢活化培养基（presporulation medium）

将菌落转移到产孢培养基之前，在此培养基上先生长1～2天。这对于那些直接接入培养基不能形成孢子的菌株是必需的。

细菌培养用酵母抽提物（0.8%）	0.8g
细菌培养用蛋白胨（0.3%）	0.3g
葡萄糖（10%）	10g
细菌培养用琼脂（2%）	2g
蒸馏水	100ml

产孢培养基

在培养基上，菌株将经几次分裂，培养3～5天后，菌株会形成孢子。

醋酸钾（1%）	10g
细菌培养用酵母抽提物（0.1%）	1g
葡萄糖（0.05%）	0.5g
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	1000ml

在产孢培养基上，营养缺陷型二倍体的孢子形成需要补充营养。对于SMM平板，用25%的补充物，这些补充物必须在培养基混合时加入。此外，也可按照SMM平板列出的体积将补充物加在孢子形成平板的表面。在接种酵母之前，让培养基表面的液体充分干燥。

基本产孢培养基

MATa/MATα 二倍体细胞在这种培养基上经过 18～24 小时就会形成孢子而没有营养体生长。

醋酸钾（1%）	10g
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	1000ml

营养缺陷型二倍体在产孢培养基中形成孢子需按时补充营养。对 SMM 平板，25% 的补充物必须在混合培养基时加入。此外，也可将补充物按照 SMM 平板列出的体积铺在孢子形成平板的表面，在接种酵母之前，平板表面必须充分干燥。

低 pH 蓝色平板

该平板用于检测放毒（酵母）的表型。

细菌培养用酵母抽提物（1%）	6g
细菌培养用蛋白胨（2%）	12g
葡萄糖（2%）	12g
细菌培养用琼脂（2%）	12g
蒸馏水	533ml

将上述成分灭菌后，加入下列溶液：

亚甲蓝无菌水溶液	5ml
磷酸-柠檬酸缓冲液（无菌）	67ml

无菌亚甲蓝水溶液：

亚甲蓝	20mg
无菌水	5ml

低 pH 值培养基的磷酸-柠檬酸缓冲液：

柠檬酸	14.07g
K_2HPO_4	18.96g
无菌水	67ml

用固体 K_2HPO_4 或柠檬酸调至 pH4.5，高压灭菌。

药物选择性培养基

5-氟-乳清酸培养基

5-氟-乳清酸（5-FOA）用来选择那些不能利用乳清酸作为嘧啶环原料的突变细胞。野生型细胞将 5-FOA 转化为 5-氟乳清苷酸，这是通过结合磷酸核糖焦磷酸（PRPP）。随后脱羧形成 5-氟-尿苷单磷酸（5-FUMP）而实现的。这两步分别由 *URA5* 和 *URA3* 酵母基因的产物所催化。显然，后来形成的 5-氟脱氧尿苷是一种很强的胸苷酸合成酶

的抑制剂，因此，对细胞很有毒。从 5-FOA 转化到 5-FUMP 必须有尿苷参与，而尿苷从头合成途经的两个步骤能被突变而阻碍其尿苷利用。只有提供尿嘧啶，通过补救途径才能形成 UMP。因此 *ura3*⁻和 *ura5*⁻突变株能在含有 5-FOA 的培养基上生长（Boeke et al.，Mol. Gen. Genet 197：345［1984］）。实际上，仅仅 *ura3*⁻突变株表现出尿嘧啶营养缺陷，催化尿嘧啶形成 PRPP 的酶可利用乳清酸作为底物，在一定底物水平下允许 *ura5*⁻突变株在缺少尿嘧啶条件下缓慢生长。

细菌培养用酵母氮碱（0.67%）	6.7g
省却尿嘧啶的混合物（0.2%）	2g
葡萄糖（2%）	20g
尿嘧啶（50μg/ml）	50mg
5-FOA（0.1%）	1g
蒸馏水	500ml

将上述成分溶解，用 0.2μm 孔径滤膜过滤除菌。

将琼脂单独高压灭菌：

细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	500ml

待琼脂冷却至 80℃时，混合上述两种溶液，每平板铺 25ml。

含 5－FOA－Ala HC 培养基

按前所述制备一升 HC 平板培养基，让三角瓶冷却到 50℃时，加 1.0g 5-FOA。

α-氨基乙二酸盐平板培养基

野生型菌株不能利用高水平 α-氨基乙二酸盐（αAA）作为惟一氮源，因为酵母可以通过正常的赖氨酸合成途径转化成有毒中间物（Chattoo et al.，*Genetics* 93：51～65［1979］；Zaret and Sherman J. Bacteriol. 162：579～583［1985］）。该培养基常用于 *LYS2* 和 *LYS5* 基因的突变筛选。

去氨基酸或硫酸铵的细菌培养用酵母氮碱（0.16%）	1.6g
赖氨酸（30mg/L）	30mg
葡萄糖（2%）	20g
细菌培养用琼脂（2%）	20g
蒸馏水	960ml

高压灭菌后，加入 40ml 的 5% αAA 溶液。

5% αAA：

α-氨基乙二酸	2g
蒸馏水	40ml

混合并用 10mol/L KOH 调至 pH6.0 使其溶解。在加入到高压灭菌的培养基之前，用 0.2μm 微孔滤膜过滤除菌。

安全须知：在操作浓碱时要格外小心，必须戴手套和面罩。

放线菌酮

放线菌酮抗性由许多不同基因产生，但高水平抗性通常由 *cyh2* 基因座发生突变而产生，*cyh2* 基因座能编码 L29 核糖体亚基，对放线菌酮的抗性是隐性的，大概是因为敏感的核糖体保持与 mRNA 结合阻止肽链的进一步延伸。

放线菌酮可用于 YPD 或合成培养基，以 10mg/L 终浓度用于 YPD，以 3mg/L 终浓度用于 SD、SC 和 YPG。母液配制：将 100mg 放线菌酮溶解于 10ml 无菌水中，然后用 0.2μm 滤膜过滤除菌，母液可在 4℃下保存，加适量的放线菌酮待到高压灭菌后的培养基中。

刀豆氨酸

刀豆氨酸是精氨酸的类似物。二者都通过 *can1* 基因座编码的高亲和通透酶送入细胞。刀豆氨酸的高水平抗性是由于该基因座发生突变而产生，但低水平抗性可由其他许多基因座所产生。

因为刀豆氨酸是一种竞争性抑制剂，必须从培养基中排除精氨酸，以便测试药物的敏感性。刀豆氨酸的抗性也必须在高氮条件下，例如在 SD 或 SC 培养基中，进行评价。因为在这种情况下，CAN1 通透酶只为精氨酸和刀豆氨酸提供进入细胞的途径，在低氮条件下，由 YPD 培养基提供的有效氮诱导基本氨基酸通透酶（GAP）系统，使精氨酸和刀豆氨酸也可由这条途径被摄取。另外，Can^R Arg^- 营养缺陷型在 YPD 上能存活，而在合成培养基上不能成活，因为它们不能摄取精氨酸。

将刀豆氨酸磺酸盐用蒸馏水制成 20mg/ml 母液，用 0.2μm 滤膜过滤除菌。保存在 4℃下，加到经高压灭菌后的 SD 或 SC－arg 培养基，以 60mg/L 的浓度用于评估和筛选刀豆氨酸抗性。

附录 B　菌株保存

酵母菌株可在 15%（v/v）的甘油中置 -60℃或更低的温度下永久保存（若在 -55℃以上保存则酵母菌易死亡）。大多研究者用装有 1ml 15%（v/v）无菌甘油的 2ml 的小瓶（35×12mm）保存菌株，这些菌株长在 YPD 平板的表面，用无菌棒或牙签将酵母刮下来，悬浮到甘油中盖紧盖子，振荡均匀后冰冻冷藏。把冷冻的样品转移到 YPD 平板上培养，酵母菌则可复苏生长。

在 YPAD 斜面培养的酵母，可在 4℃下保存 6 个月，因为斜面占用空间小，不会干燥，并含有充足的腺嘌呤以防止一些 *ade*$^-$ 突变株所产生的红色素引起的毒性。所以，斜面保藏既方便又利于邮寄。

参 考 文 献

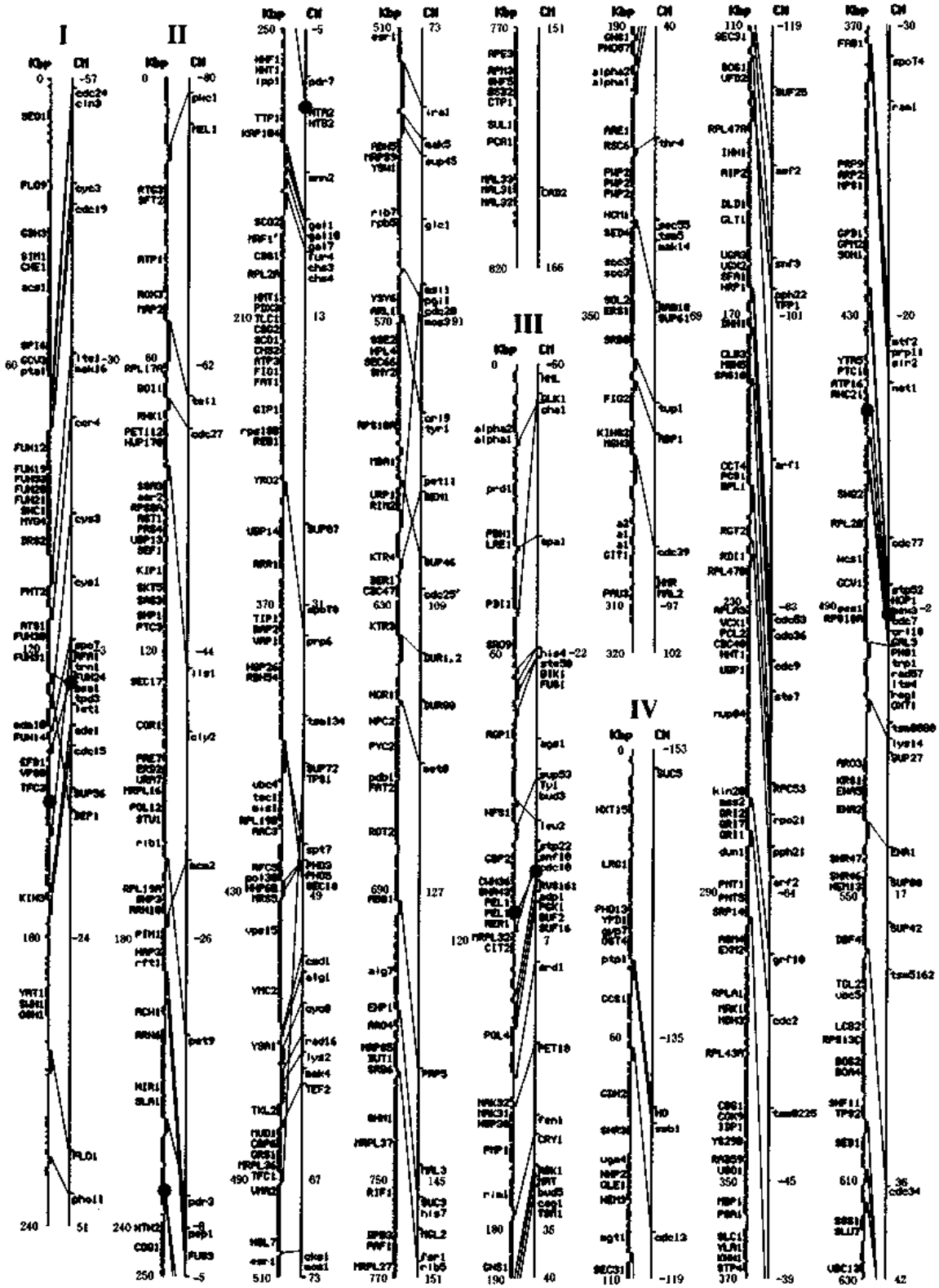
Well, A. M. and G. G. Stewart. 1973. Storage of brewing yeasts by liquid nitrogen refrigeration. *Appl. Microbiol.* 26: 577.

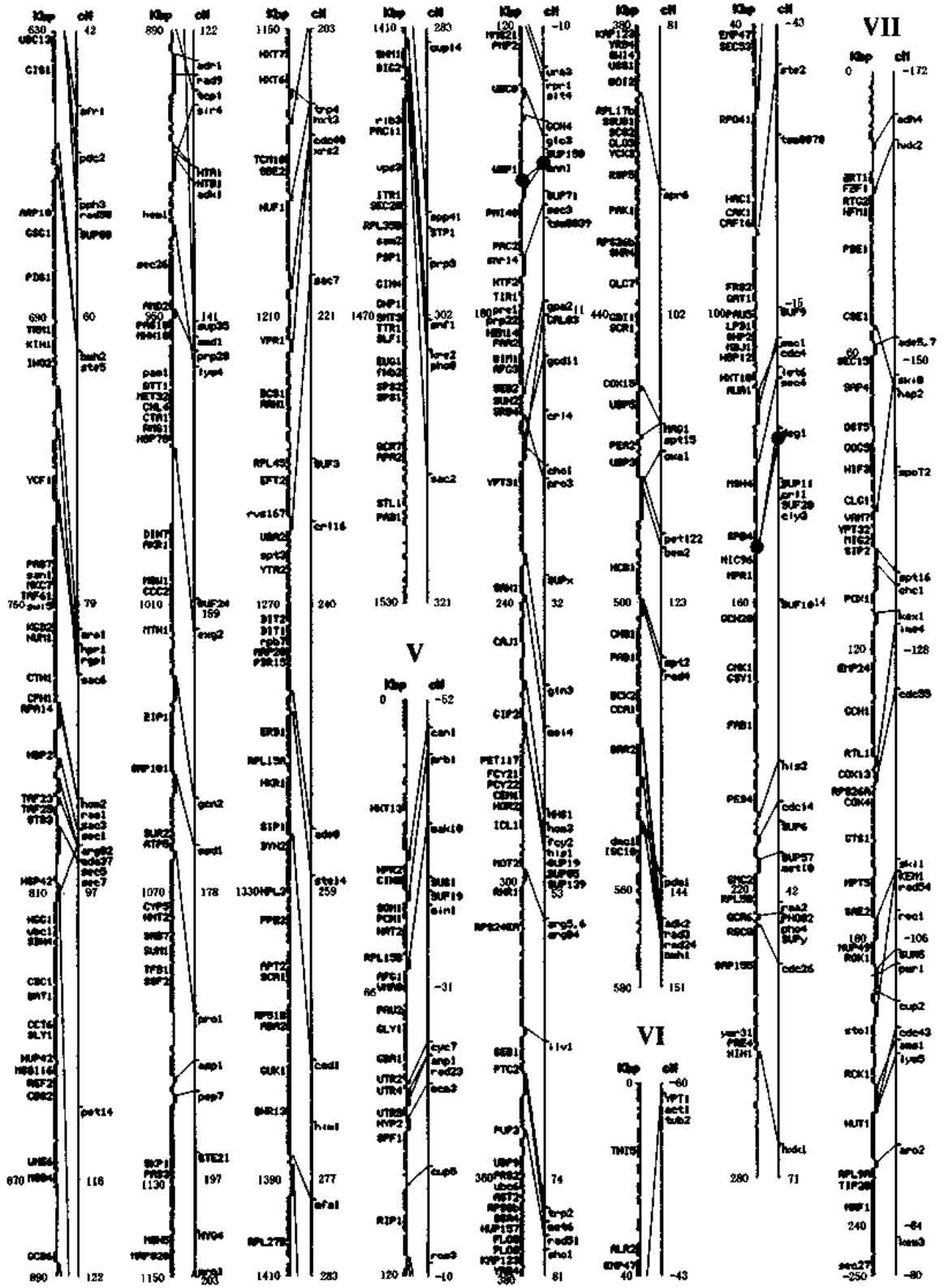
附录 C　酵母遗传图谱和物理图谱

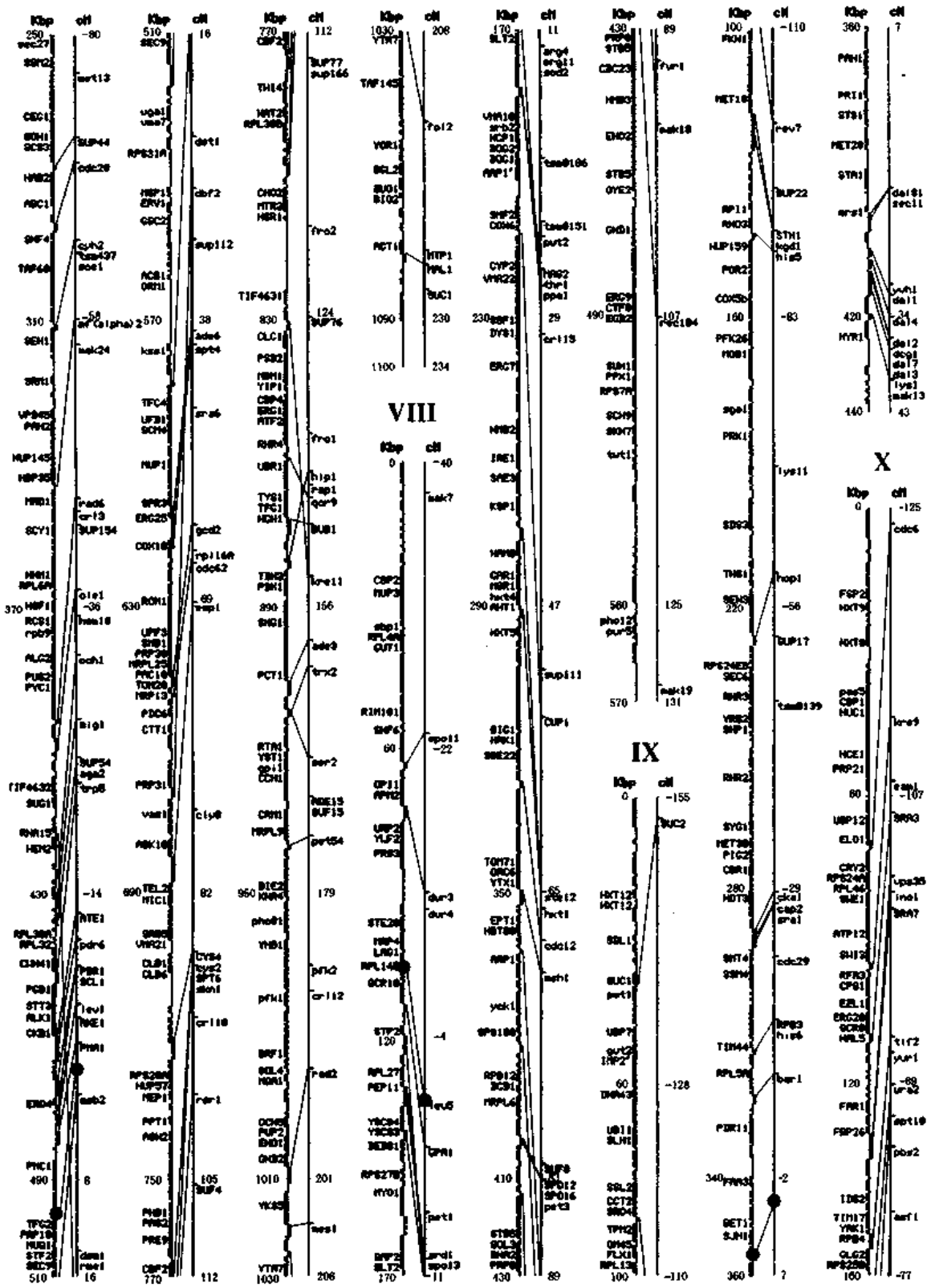
在 114～119 页的附图中，描述了酿酒酵母的 16 条染色体遗传学图谱和物理图谱以及它们的相互关系。文中用图解的方式将 16 条染色体的每一条物理图谱（左图，以 kb 为单位）和遗传图谱（右图，以厘摩为单位）进行了平行比较。在这个图中，一些有用的信息在酿酒酵母基因组数据库(http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/)中可以找到。物理图谱上的阴影部分表示阅读框；在 Watson 链（左端粒是此链的 5′端）上的阅读框用浅灰色阴影表示；在 Crick 链上的阅读框则用深灰色阴影表示。只要是被标明的区域，都给出了阅读框的基因名称。遗传学图谱的建立是基于 1991 年 SGD 项目或更早的数据。位于右边遗传学图谱上的水平线，标明了各基因的位置，遗传图谱上的基因与物理图谱的相应阅读框之间用线连接起来，对已知的同义词列出了单个名字（经同意重版，Cherry et al.［1997］*Nature* 387：［supplement］67～73. Copyright Macmillan Magazines Ltd.）。

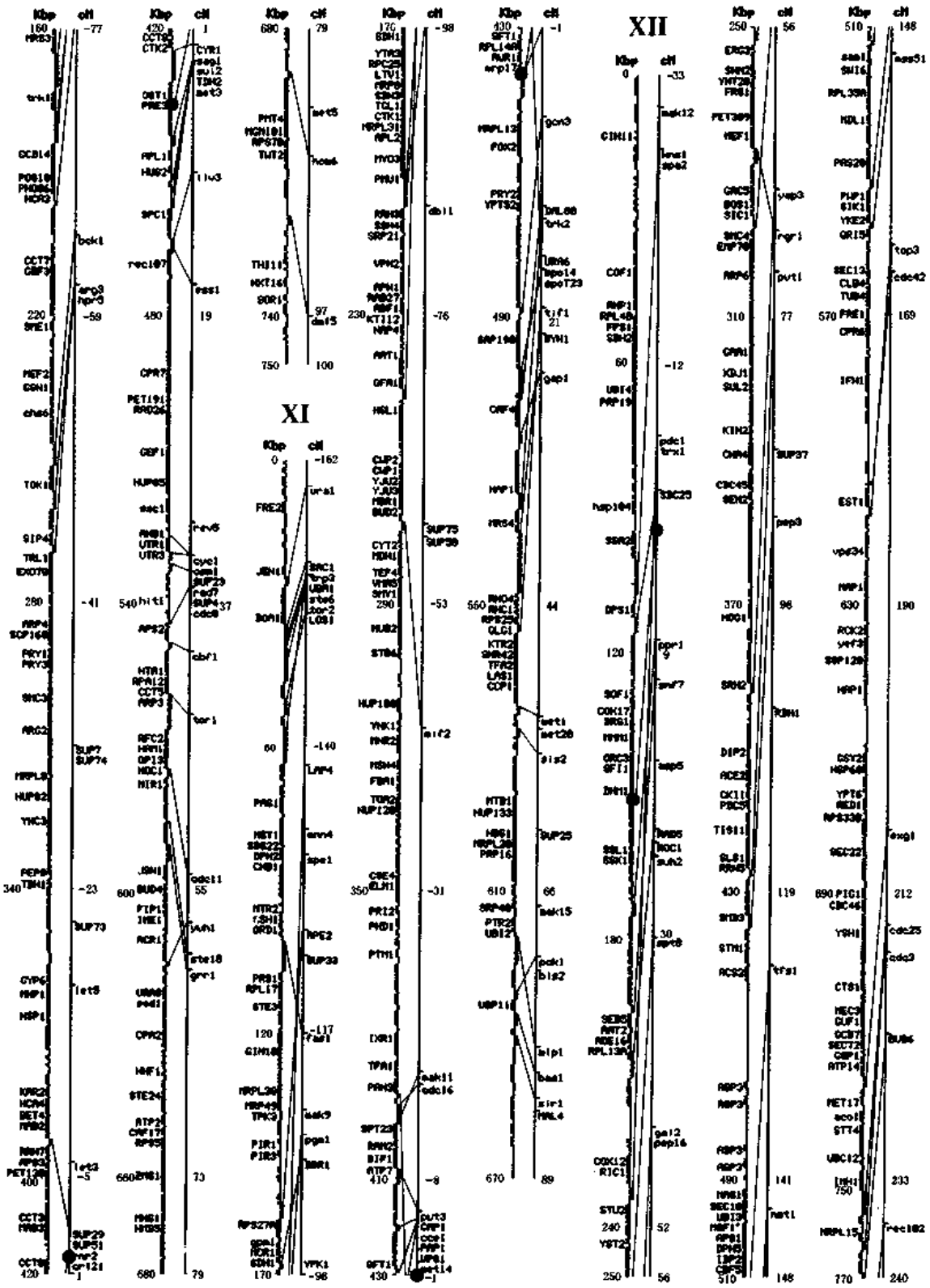
参 考 文 献

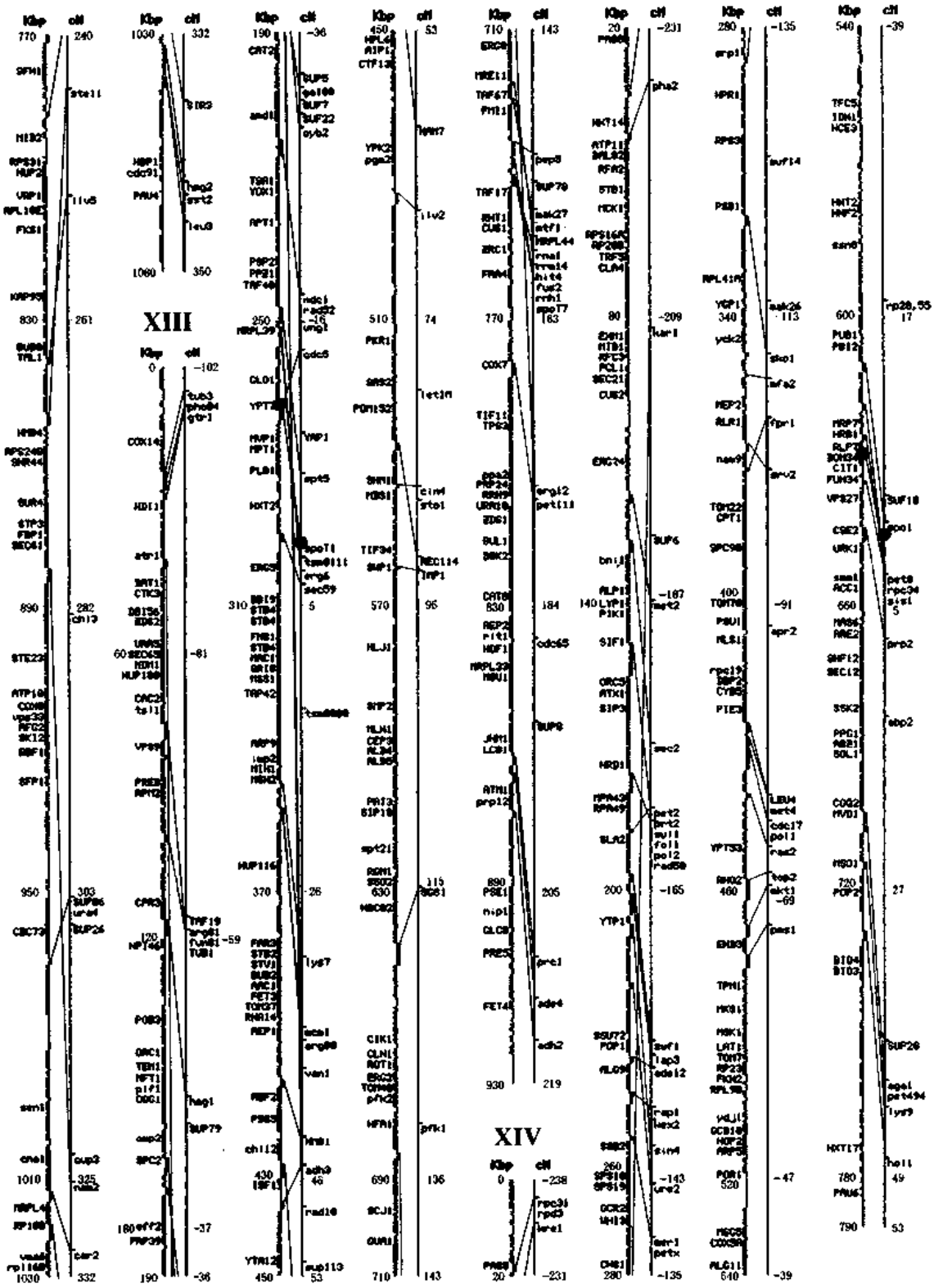
Cherry, J. M., C. Ball, S. Weng, G. Juvik, R. Schmidt, C. Adler, B. Dunn, S. Dwight, L. Riles, R. K. Mortimer, and D. Botstein. 1997. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 387: (suppl.) 67～73.

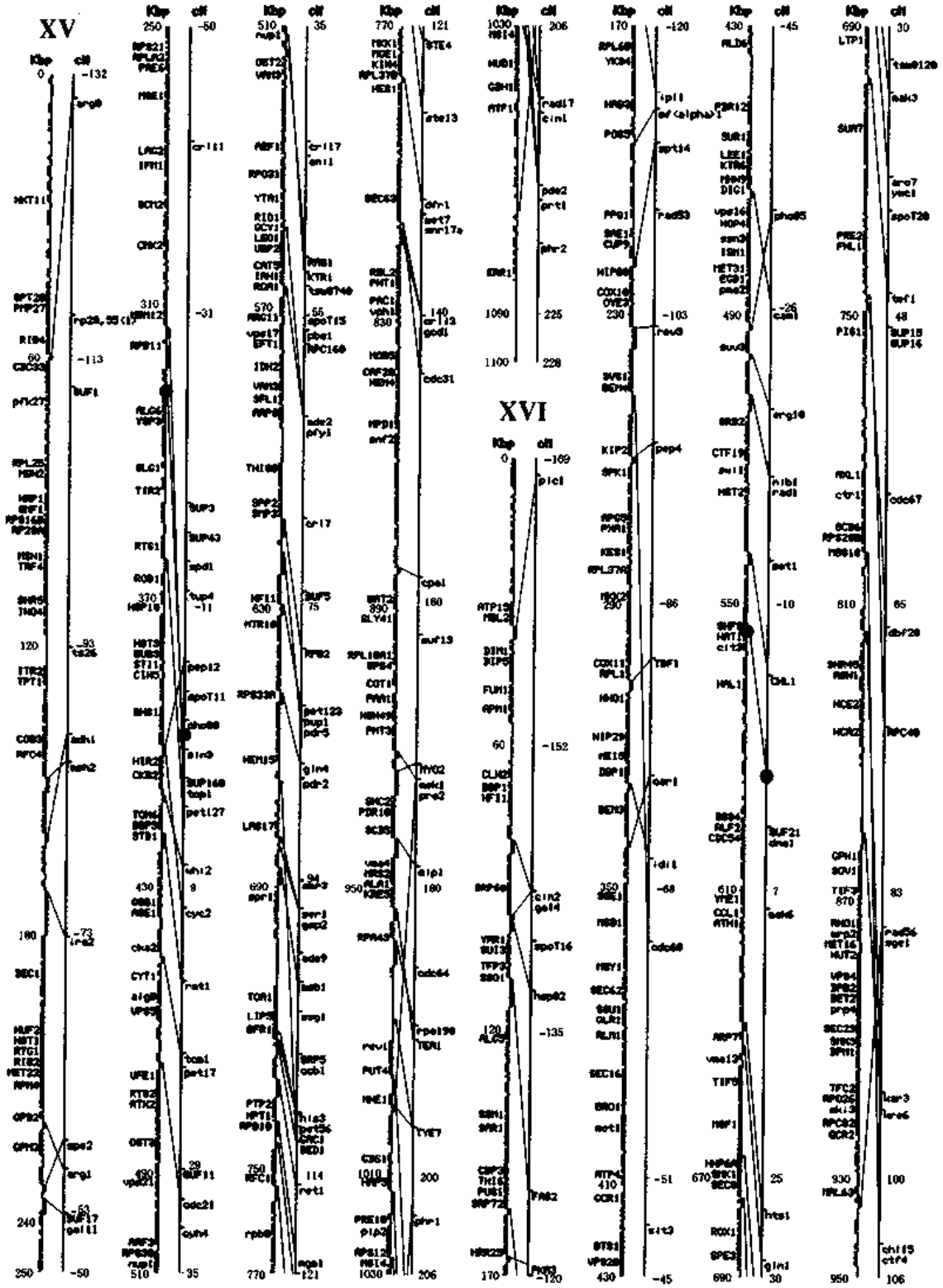

I
II
III
IV
Kbp
CM


V
VI
VII

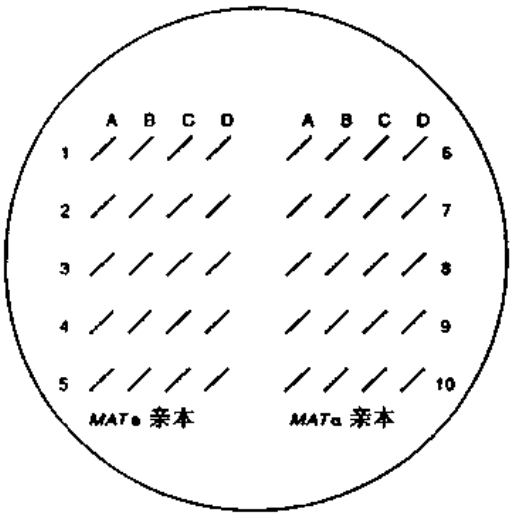


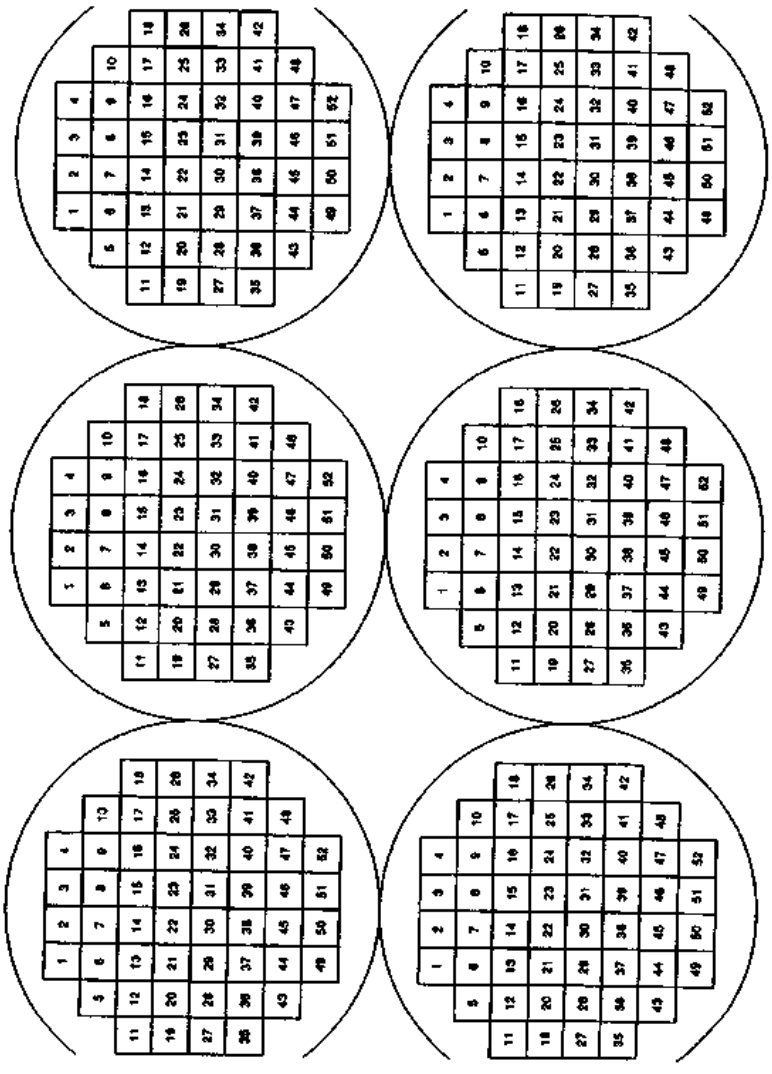

XI
XII


XIII
XIV


XV
XVI

附录D　模格





附录 E　用于 Southern 印迹作图的菌株电泳核型

注意：此附录的内容基本上被酵母基因组的测序（见附录 C）所取代，但该信息对于用脉冲凝胶电泳来估计整个染色体的大小是有用的。

染色体定位

（引自 Carle and Olson [1985] *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82：3756～3760.）

电泳谱带与染色体的对应关系

电泳谱带	染色体	特异鉴定杂交探针
1	Ⅰ	CDC19
2	Ⅵ	SUP11
3	Ⅲ	SUP61
4	Ⅸ	SUP17
5A	Ⅶ	ARG4
5B	Ⅴ	URA3
6	Ⅺ	URA1
7	Ⅹ	URA2
8	ⅩⅣ	SUF10
9	Ⅱ	LYS2
10A	ⅩⅢ	SUP8
10B	ⅩⅥ	GAL4
11A，B	ⅩⅤ，Ⅷ	SUP3，LEU1
12	Ⅳ	SUP2

指定菌株

菌株	解离双联体	基因型
AB972	（标准）	*MATα trp*1
A364a	5A，5B	*MAT*a *ural lys*2 *ade*2 *ade*1 *his*7 *tyr*1
YPH45	10A，10B	*MAT*a *ura*3－52 *lys*2 *ade*2 *trp*1－Δ1

作图菌株

菌株	基因型
YPH80	*MATα ura*3-52 *lys*2 *ade*⁻ *his*7 *trp*1-Δ1
YPH81	*MAT*a *ura*3-52 *lys*2 *ade*⁻ *trp*1-Δ1

YPH149 和 YPH152 分别是 YPH80 和 YPH81 的衍生菌，通过两个染色体断裂衍生

而来。它们与标准核型相比有如下不同：

第 11 条带相当于染色体XV，（没有染色体Ⅶ）。

衍生于染色体Ⅶ和携带着丝粒近端的 RAD2 序列的一条染色体片段（URA3$^+$）迁移到谱带 10b 和 11 之间。

衍生于染色体Ⅶ和携带着丝粒远端的 RAD2 序列的一条染色体片段（TRP$^+$）迁移到谱带 1 的下面。

生长在基本培养基（选择 URA$^+$）上的 YPH149 和 YPH152 呈现出一个很强的 90kb 染色体片段。

参考文献

Carle, G. F. and M. V. Olson. 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 3756～3760.

附录F 菌　　株

实验 1　酵母细胞的观察

1-1	TSY623	*MATα ade2 his3 leu2 ura3*
1-2	TSY807	*MATa his3 leu2 lys2 ura3*
1-3	TSY800	*MATa/α ADE2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 lys2/LYS2 ura3/ura3*
1-4	TSY481	*MATa/α ADE2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 LYS/lys2 ura3/ura3* [pTS568]
1-5	TSY514	*MATa his3 leu2 lys2 ura3* [pTS592]

实验 2　营养缺陷型、温度敏感型和紫外敏感型突变株的分离和鉴定

2-1	S288C	*MATα mal gal2*
2-2	P665-1A	*MATa*

实验 3　减数分裂作图

3-1	1385-3B	*MATa his4-G met13 lys2 ho∴ LYS2*
3-2	1384-10D	*MATα his4-N met4 ura3 leu2 trp1 lys2 ho∴ LYS2*
3-3	1385-3B×1384-10D	
3-4	FW786	*MATa ade8*
3-5	FW787	*MATα ade8*
3-10	ERX-17C	*MATa his4-N met4 ade8*
3-11	ERX-3C	*MATα his4-N met4 ade8*
3-12	ER3a	*MATa his4-G met13 ade8*
3-13	ER3α	*MATα his4-G met13 ade8*

实验 4　有丝分裂重组和随机孢子分析

4-1	TSY812	*MATα can1 hom3 leu2 lys2 ura3*
4-2	TSY813	*MATa ade2 his1 lys2 trp1*

实验 5　酵母转化

5-1	TSY623	*MATα ade2-201 his3-Δ200 leu2-3，112 ura3-52*
5-2	TSY502	*MATa his3-Δ200 leu2-3，112 lys2-801 ura3-52 tub4-34*
5-3	TSY807	*MATa his3-Δ200 leu2-3，112 lys2-801 ura3-52*
5-4	TSY808	*MATa ade2-101*

实验 6　胞导和核配

6-1	DG21	*MATa kar1 ara2 ade3 ura3*
6-2	DDM30B	*MATα ade2 can1 ura3Δ trp1Δ leu2 ade5 cyh2^R lys5*
6-3	PT1	*MATa ile hom3 can^R*
6-4	PT2	*MATα ile hom3 can^R*

实验 7　基因置换

7-1　BY4732　*MATa his3Δ200 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0*

7-2　UCC1118　*MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15 Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 Δhhf2-hht2::MET15 Δhhf1-hht1::LEU2* [*pRM200U*（*URA3 CEN ARS HHF2-HHT2*）]

实验 8　*ras2* 抑制基因的分离

8-6　1784TRP　*MATa RAS2 his4 ura3 leu2 can1*

8-7　AMP141　*MATa ras2-530::LEU2 his4 ura3 leu2 trp1 can1*

8-8　AMP142　*MATa ras2-530::LEU2 his4 ura3 leu2 lys2 can1*

实验 9　细胞型操作

9-1　CKY8　*MATα ura3-52leu2-3，112*

9-2　AAY1017　*MATα his1*

9-3　AAY1018　*MATa his1*

9-4　YSC006　*MAT $\bar{\alpha}$ ura3 ade2-1 trp1-1* can1-100 leu2-3，112 *his3-11，15* [*psi*$^+$] *GAL*$^+$

9-5　YSC005　*MATa ura3 ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3，112 his3-11，15* [*psi*$^+$] *GAL*$^+$

实验 10　用插入穿梭诱变法分离蓍丝粒沉默抑制基因

10-1　UCC3505　*MATa ura3-53 lys2-801 ade2-101 leu2-Δ1 his3-Δ200 Δpprl::LYS2 adh4::URA3-TEL-VIIL ADE2-TEL-VR*

实验 11　双杂合蛋白互作分析法

11-1　Y190　*MATa gal4 gal80 his3-Δ200 trp1-901 ade2-101 leu2-3，112 lys2：GAL-HIS3：LYS2 ura3-52：GAL-lacZ：URA3 Cyh*^{r}

11-2　Y187　*MATα gal4 gal80 his3-Δ200 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3，112 ura3-52：GAL-lacZ：URA3.*

11-3　TSY801　Y190 [pTS434]

11-4　TSY802　Y187 [pTS721]

11-5　TSY803　Y190 [pAS1]

11-6　TSY804　Y187 [pACTⅡ]

11-7　TSY805　Y190 [pTS428]

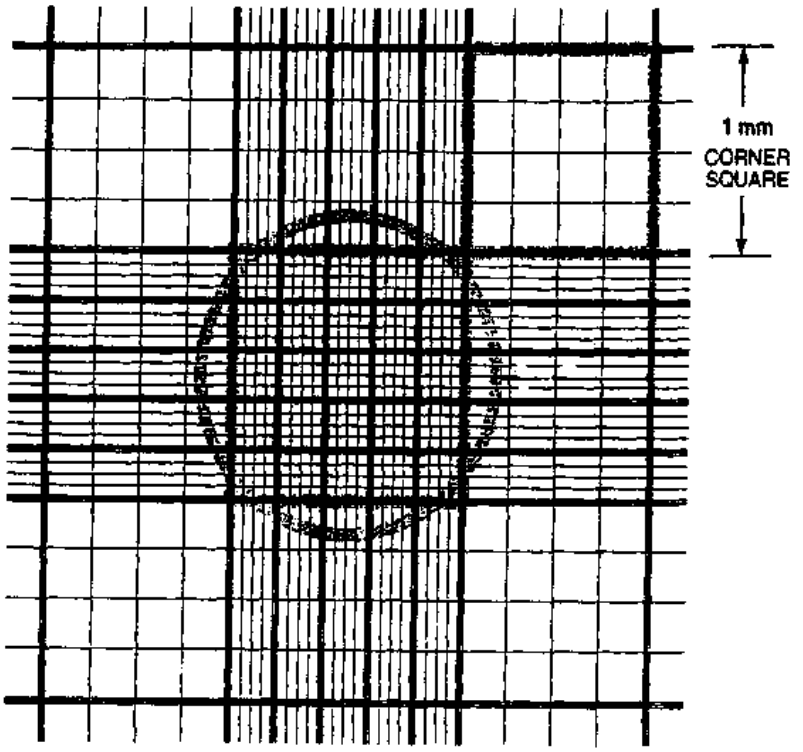
11-8　TSY806　Y190 [pTS430]

附录 G　用标准血球计数板进行酵母计数

(A. Kistler and S. Michaelis)

用 10×物镜（配 10×目镜），可在视野中看到下图圆圈内所示的“大”方格，此方格容纳 0.1μl 体积，因此，每毫升特定培养物中的细胞数可用下列公式计算：

细胞数/每个方格×10^4×稀释倍数＝细胞数/ml 培养物



标准血球计数板

（根据 Sigma-Aldrich Co. [copyright 1994] 修改）

不同酵母培养物中的细胞数

培养物	OD_{600}	细胞数	用血球计数板稀释计数
Sat'd YEPD	25	3×10^8/ml	10^{-2}or 10^{-3}
Log YPD	0.25	3×10^6/ml	10^0 or 10^{-1}
Sat'd SC－LYS	5	1×10^8/ml	10^{-1} or 10^{-2}

一般来说，最好使用 40×物镜，这样视野中就只有一部分圈内的方格看得见。即几个“小”方格（上图左下方标明了一个小方格的区域），然后数出 5 个小方格内的细胞数，用下列公式计算：

5 个小方格内的细胞数×5×10^4×稀释倍数＝细胞数/ml 培养物